



# Identification de nouveaux biomarqueurs permettant la caractérisation des lymphocytes T CD8 mémoires innés

Morgan Grau

## ► To cite this version:

Morgan Grau. Identification de nouveaux biomarqueurs permettant la caractérisation des lymphocytes T CD8 mémoires innés. Immunologie. Université de Lyon, 2016. Français. NNT : 2016LYSE1023 . tel-01381719

**HAL Id: tel-01381719**

**<https://theses.hal.science/tel-01381719>**

Submitted on 14 Oct 2016

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

N° d'ordre : 23-2016

**THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON**

Délivrée par

L'université Claude Bernard Lyon 1

Ecole Doctorale de Biologie Moléculaire, Intégrative et Cellulaire

*En vue d'obtenir le grade de*

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LYON**

Spécialité : Sciences de la vie

*Présentée et soutenue publiquement le 17 Février 2016 par*

**Morgan GRAU**

---

**Identification de nouveaux biomarqueurs permettant la  
caractérisation des lymphocytes T CD8 mémoires innés**

---

Directrice de thèse : Dr Jacqueline MARVEL

Après avis du Dr Emmanuel Donnadiou et du Dr Victor Appay

**Devant la commission composée de :**

Pr Mathias Faure	Président
Dr Emmanuel Donnadiou	Rapporteur
Dr Victor Appay	Rapporteur
Dr Philippe Bousso	Examineur
Dr Jacqueline Marvel	Membre



# UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

## **Président de l'Université**

Vice-président du Conseil d'Administration

Vice-président du Conseil des Etudes et de la Vie  
Universitaire

Vice-président du Conseil Scientifique

Directeur Général des Services

**M. François-Noël GILLY**

M. le Professeur Hamda BEN HADID

M. le Professeur Philippe LALLE

M. le Professeur Germain GILLET

M. Alain HELLEU

## ***COMPOSANTES SANTE***

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles  
Mérieux

Faculté d'Odontologie

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation

Département de formation et Centre de Recherche en  
Biologie Humaine

Directeur : M. le Professeur J. ETIENNE

Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON

Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS

Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA

Directeur : M. le Professeur Y. MATILLON

Directeur : Mme. la Professeure A-M. SCHOTT

## ***COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE***

Faculté des Sciences et Technologies

Département Biologie

Département Chimie Biochimie

Département GEP

Département Informatique

Département Mathématiques

Département Mécanique

Département Physique

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et  
Sportives

Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon

Polytech Lyon

Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Ecole Supérieure du Professorat et de l'Education

Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : M. F. DE MARCHI

Directeur : M. le Professeur F. FLEURY

Directeur : Mme Caroline FELIX

Directeur : M. Hassan HAMMOURI

Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE

Directeur : M. le Professeur Georges TOMANOV

Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID

Directeur : M. Jean-Claude PLENET

Directeur : M. Y.VANPOULLE

Directeur : M. B. GUIDERDONI

Directeur : M. P. FOURNIER

Directeur : M. G. PIGNAULT

Directeur : M. le Professeur C. VITON

Directeur : M. le Professeur A. MOUGNIOTTE

Directeur : M. N. LEBOISNE



## ***Remerciements***

Merci aux membres de mon jury, pour avoir accepté de juger ce travail de thèse. Merci à mes deux rapporteurs, Messieurs Appay et Donnadiou, pour le temps qu'ils ont consacré à l'évaluation de ce travail. Merci également à Mr Bousso pour sa participation en qualité d'examineur. Enfin, merci à Mr Faure d'avoir accepté de présider ce jury.

Merci aux membres de mon comité de suivi de thèse, Messieurs Caux et Balabanian. Merci pour vos nombreuses remarques constructives qui m'ont permis d'avancer et de mener à bien ce projet.

Merci à ma directrice de thèse, Jacqueline Marvel. Merci de m'avoir encadré et formé à la recherche durant ces trois années de thèse.

Enfin, merci à tous mes collègues de travail que j'ai pu côtoyer durant ces trois années de thèse.

# SOMMAIRE

<b>TABLE DES ILLUSTRATIONS</b>	<b>7</b>
<b>PRINCIPALES ABREVIATIONS</b>	<b>8</b>
<b>INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE</b>	<b>11</b>
<b>I. LES LT CD8 NAÏFS, PRECURSEURS DES LT MEMOIRES.</b>	<b>14</b>
<b>A. Génération et maturation</b>	<b>14</b>
1. Génération du récepteur antigénique des LT	14
2. La sélection thymique	15
<b>B. Localisation</b>	<b>19</b>
<b>C. Survie</b>	<b>22</b>
1. Le signal TCR	22
2. Le signal cytokinique	22
<b>II. LES LT CD8 MEMOIRES CONVENTIONNELS</b>	<b>24</b>
<b>A. Les modèles de LT CD8 transgéniques pour le TCR</b>	<b>26</b>
<b>B. Génération</b>	<b>27</b>
1. Activation des LT CD8 naïfs	27
a) Interaction avec les DC	27
b) 3 signaux nécessaires à l'activation	32
c) Le help CD4	40
2. Prolifération clonale et switch métabolique	42
3. La différenciation en cellules effectrices	43
a) Les fonctions cytotoxiques	43
b) La production de cytokines	45
4. Différenciation en LT CD8 mémoires conventionnels	46
a) Le modèle SLEC / MPEC	46
b) Facteurs régulant la différenciation en SLEC et MPEC	47
c) La phase de contraction de la réponse immunitaire	57
<b>C. Caractéristiques des LT CD8 mémoires conventionnels</b>	<b>60</b>
1. Hétérogénéité	60
2. Fréquence augmentée de cellules spécifiques d'un antigène	63
3. Maintien à long terme	64
4. Etat hyper-répondeur	65
a) Modification post-traductionnelle des histones	65
b) Demethylation des îlots CpG	66
c) Conséquence sur l'expression des gènes	68
5. Réponses de type innées des LT CD8 mémoires	70
a) Réactivité augmentée à l'IL-12 et l'IL-18	70
b) Expression de récepteurs de cellules NK	70
6. Accès aux tissus périphériques	73
<b>III. LYMPHOCYTES T CD8 MEMOIRES INNES</b>	<b>76</b>
<b>A. LT CD8 mémoires innés générés de manière expérimentale</b>	<b>77</b>

1. Prolifération homéostatique induite par lymphopénie	77
a) Le signal cytokinique	77
b) Le signal TCR	80
2. Augmentation de la disponibilité en cytokines $\gamma$ c	83
a) IL-4	83
b) IL-2	85
<b>B. Génération physiologique de LT CD8 mémoires innés</b>	<b>85</b>
1. Stimulations fortes par des cytokines $\gamma$ c.	86
2. Absence de signal TCR fort	87
<b>C. Caractéristiques des LT CD8 mémoires innés</b>	<b>88</b>
1. Phénotype	88
2. Fonction	90
a) LT CD8 mémoires innés générés expérimentalement	90
b) LT CD8 mémoires innés générés physiologiquement	91
<b>D. LT CD8 mémoires innés chez l'homme</b>	<b>92</b>
<b>IV. CONCLUSION GENERALE ET PRESENTATION DU TRAVAIL DE THESE</b>	<b>95</b>
<b>RESULTATS</b>	<b>99</b>
<b>DISCUSSION</b>	<b>141</b>
<b>ANNEXES</b>	<b>161</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b>	<b>179</b>

## **Table des illustrations**

**Figure 1 :** TCR formé par recombinaisons aléatoires entre différents segments géniques.

**Figure 2 :** Sélection thymique conservant uniquement les thymocytes capables de reconnaître les antigènes du soi tout en les tolérant.

**Figure 3 :** Migration ordonnée des LT CD8 naïfs au sein des ganglions lymphatiques.

**Figure 4 :** Récepteurs des cytokines de la famille  $\gamma c$ .

**Figure 5 :** La synapse immunitaire.

**Figure 6 :** Principales voies de signalisations activées par engagement fort du TCR.

**Figure 7 :** Facteurs régulant la différenciation des LT CD8 naïfs en SLEC ou MPEC.

**Figure 8 :** Hétérogénéité de la population de LT CD8 mémoires conventionnels.

**Figure 9 :** Modifications épigénétiques permettant l'acquisition de l'état hyper répondeur des LT CD8 mémoires conventionnels.

**Figure 10 :** Localisation anatomique des LT CD8 mémoires conventionnels.

**Figure 11 :** Disponibilité augmentée en IL-7 dans un environnement lymphopénique.

**Figure 12 :** La population de LT CD8 de phénotype mémoire comporte deux classes de cellules.

**Figure 13 :** CCL5 et NKG2D sont deux biomarqueurs des LT CD8 mémoires conventionnels.

**Figure 14 :** Les LT CD8 mémoires innés sont à la frontière entre cellules naïves et cellules mémoires conventionnelles.

**Tableau 1 :** Principaux marqueurs mémoires.

**Tableau 2 :** Principales lignées de LT CD8 transgéniques pour le TCR.

**Tableau 3 :** Principales molécules de costimulation.

**Tableau 4 :** Principaux récepteurs NK exprimés par les LT CD8 mémoires conventionnels.

**Tableau 5 :** Molécules impliquées dans la migration des LT CD8.

**Tableau 6 :** Lignées murines mutantes caractérisées pour la présence de LT CD8 mémoires innés.

**Tableau 7 :** Phénotype identique des LT CD8 mémoires conventionnels et innés.

## Principales abréviations

ADN	Acide DésoxyRibonucléique
AIRE	AutoImmune REgulator
AP-1	Activator Protein 1
APC	Antigen Presenting Cells
APL	Altered Peptide Ligands
ARNm	Acide RiboNucléique messenger
ATP	Adénosine Triphosphate
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CSH	Cellule Souche Hématopoïétiques
cTEC	Cellules Epithéliales Thymiques Corticales
CTLA4	Cytotoxic T Lymphocyte Antigen 4
DAP	DNAX-Activating Protein
DC	Dendritic Cells
DISC	Death-Inducing Signaling Complex
DN	Double Négatif
EBV	Epstein-Barr Virus
Flu	Influenza Virus
GM-CSF	Granulocytes and Macrophages Colony Stimulating Factor
HAT	Histones acetyltransferase
HDAC	Histones desacetylases
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HSV	Herpes Simplex Virus
IEL	Intraepithelial Lymphocyte
IFN	Interferon
ITAM	Immuno receptor Tyrosine-based Activation Motif
JAK	Janus Kinase
KLRG1	Killer cell Lectin-like Receptor subfamily G member 1
LB	Lymphocytes B
LCMV	Lymphocytic Choriomeningitis Virus
LIP	Lymphopenia-Induced Proliferation
Lm	<i>Listeria monocytogenes</i>
LPS	Lipopolysaccharide
LT	Lymphocyte T
MCMV	Mouse CytoMegaloVirus
MHV	Mouse $\gamma$ Herpes Virus
MPEC	Memory Precursor Effector Cell
mTEC	Cellules Epithéliales Thymiques Médullaires
MTOC	Micro tubule Organizing Center
mTOR	Mamalian Target Of Rapamycin
NF- $\kappa$ B	Nuclear Factor Kappa B
NFAT	Nuclear Factor of Activated T cells
NK	Natural Killer
NKG2A	Killer cell lectin-like receptor subfamily C, member 1-like
NKG2D	Natural-killer group 2, member D
NKT	Natural Killer T cells
OLS	Organe Lymphoïde Secondaire

PLC	Progéniteur Lymphoïde Commun
PLZF	Promyelocytic Leukemia Zinc Finger
SLEC	Short Lived Effector Cells
SMACs	Supra Molecular Activation Clusters
SP	Simple Positif
SPF	Specific Pathogen Free
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription
TAP	Transporter associated with Antigen Processing
TCM	T Central Memory
TCR	T Cell Receptor
TEM	T Effector Memory
TNF	Tumor Necrosis Factor
TRA	Tissue Restricted Antigen
TRM	Tissue Resident Memory
VV	Vaccinia Virus

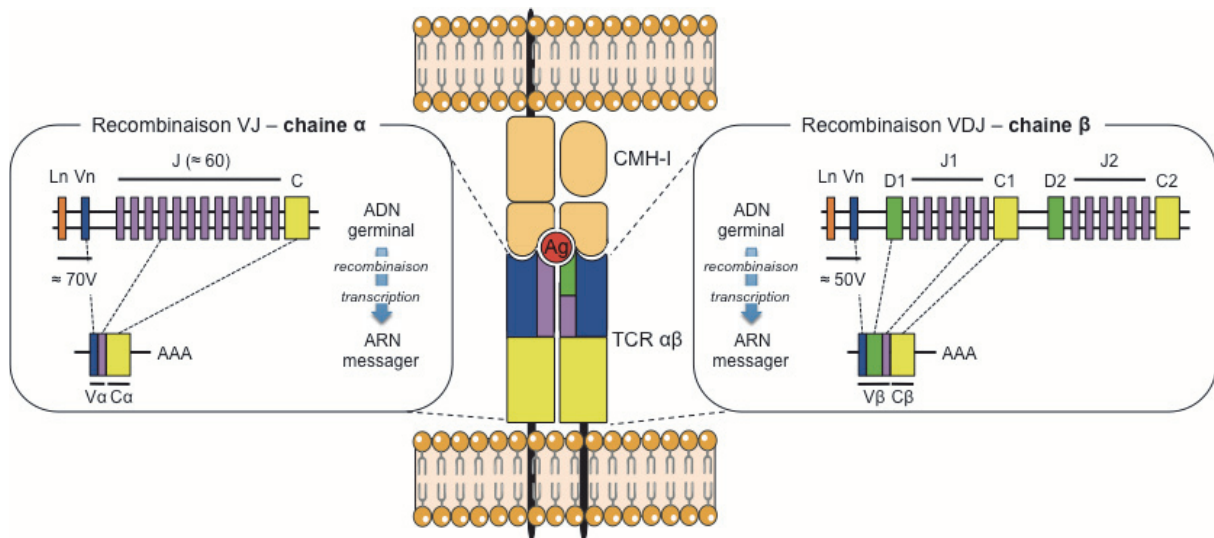




# Introduction bibliographique

Au XVIII<sup>e</sup> siècle, alors que des épidémies de variole font des milliers de victimes, le médecin Anglais Edward Jenner fait l'observation que des fermiers en contact régulier avec le virus de la vaccine (VV) ne sont jamais infectés par le virus de la variole. En 1796, il démontre que l'inoculation volontaire de pus provenant de plaies induites par VV protège l'organisme humain de la variole. Ce fut la première mise en évidence d'une propriété fondamentale du système immunitaire adaptatif, la mémoire immunitaire, qui sera plus tard exploitée par Louis Pasteur pour développer le principe de la vaccination. Par définition, la mémoire immunitaire est la capacité du système immunitaire à répondre plus rapidement et plus efficacement aux pathogènes avec lesquels **il a déjà été en contact** afin de les empêcher de causer à nouveau la maladie. Cette réponse immunitaire améliorée est permise grâce à la génération de cellules mémoires lors d'un premier contact avec un agent pathogène. Ces cellules mémoires possèdent en effet un grand nombre de caractéristiques spécifiques leur permettant de réagir plus rapidement et plus efficacement lors d'un second contact avec le même agent pathogène. Bien que le contact préalable avec un agent pathogène soit un prérequis essentiel à l'établissement de la mémoire immunitaire, de très nombreuses études rapportent que des cellules immunitaires possédant des caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles de cellules mémoires sont générées en absence apparente d'infection par un pathogène ou de transformation tumorale. Ce phénomène paradoxal est particulièrement bien documenté au sein de la population de lymphocytes T (LT) CD8. En effet, ces LT CD8 mémoires dits innés sont générés dans des conditions physiologiques. La population de LT CD8 mémoires est donc une population de cellules hétérogène, composée de deux classes de cellules mémoires. D'une part, les LT CD8 mémoires conventionnels générés lors d'une réponse primaire contre un pathogène ou une tumeur. D'autre part, les LT CD8 mémoires innés générés en absence apparente de la reconnaissance d'antigènes dérivés de pathogènes ou de cellules tumorales.

Au cours de cette introduction bibliographique, nous développerons les deux grands mécanismes identifiés à ce jour permettant la génération de LT CD8 mémoires. Une comparaison des propriétés phénotypiques et fonctionnelles décrites pour chacune de ces classes de cellules mémoires sera également proposée.



**Figure 1 : TCR formé par recombinaisons aléatoires entre différents segments géniques.** Schéma représentant la structure d'un TCR $\alpha\beta$ , lié à un complexe CMH-I/antigène (Ag). Chaque chaîne est composée d'une partie constante (C $\alpha$  et C $\beta$ ) et d'une partie variable (V $\alpha$  et V $\beta$ ). C'est la partie variable de chaque chaîne qui détermine la spécificité antigénique du TCR. Cette partie variable est formée par recombinaison aléatoire entre différents segments géniques. Pour la chaîne  $\alpha$ , la recombinaison VJ permet de réarranger aléatoirement un des 70 segments V et un des 60 segments J présents au niveau du locus codant pour cette chaîne  $\alpha$ . Pour la chaîne  $\beta$ , la recombinaison VDJ permet de réarranger aléatoirement un des 50 segments V, un des 2 segments D et un des 12 segments J présents au niveau du locus codant pour cette chaîne  $\beta$ . Ce processus de recombinaison dépend de l'activité des recombinases RAG1 et RAG2 (non montrées sur ce schéma).

## **I. Les LT CD8 naïfs, précurseurs des LT mémoires.**

### **A. Génération et maturation**

Toutes les cellules du système immunitaires proviennent de la différenciation de cellules souches hématopoïétiques (CSH). Le lignage lymphoïde est déterminé très tôt par une première différenciation des CSH en progéniteur lymphoïde commun (PLC). La génération des LT a lieu dans le thymus. Ainsi, certains PLC migrent depuis la moelle osseuse vers le thymus pour subir une étape de maturation (Baba et al., 2004). Au cours de ce processus, les thymocytes immatures subissent plusieurs étapes de différenciation, identifiées par l'expression de différentes molécules au niveau de la membrane plasmique, notamment les co-récepteurs CD4 et CD8. En pénétrant dans le thymus, les thymocytes immatures n'expriment aucun des ces co-récepteurs, on parle alors de stade de différenciation double négatif (DN).

#### **1. Génération du récepteur antigénique des LT**

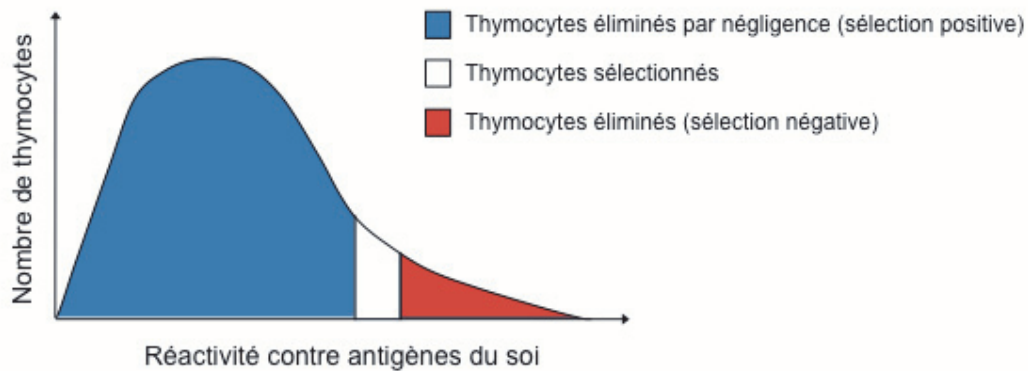
Lors du stade DN, les thymocytes commencent à exprimer les gènes codants pour le récepteur antigénique des LT, appelé TCR (T Cell Receptor). Le TCR permet aux thymocytes qui l'expriment de reconnaître spécifiquement des antigènes associés à une molécule de CMH (Complexe Majeur d'Histocompatibilité). Le processus de génération particulier de ce récepteur antigénique permet de produire une très grande diversité de TCR, chacun ayant sa propre spécificité antigénique. On distingue plusieurs type de TCR : les TCR formés d'une chaîne  $\alpha$  et d'une chaîne  $\beta$  (TCR $\alpha\beta$ ) et les TCR formés d'une chaîne  $\gamma$  et d'une chaîne  $\delta$  (TCR $\gamma\delta$ ). Pour plus de clarté, nous parlerons à présent uniquement des LT exprimant un TCR $\alpha\beta$ , ces cellules représentant la grande majorité des LT périphériques. Chaque chaîne du TCR $\alpha\beta$  est constituée d'une partie constante et d'une partie variable. La partie variable, impliquée dans la reconnaissance de l'antigène, est formé par un processus de recombinaisons aléatoires entre plusieurs segments géniques (V, D et J pour la chaîne  $\beta$  et V et J pour la chaîne  $\alpha$ ) sous contrôle des recombinases RAG1 et RAG2 (**Figure 1**) (Abbey and O'Neill, 2008). Ainsi, chaque TCR formé via ce processus de recombinaison aléatoire est unique et possède sa propre spécificité antigénique, permettant au thymocyte qui l'exprime de reconnaître un nombre limité d'antigènes, présentés en association avec une molécule de CMH. Une fois l'expression du TCR achevée, les thymocytes expriment les deux co-

récepteurs CD4 et CD8, on parle alors de stade double positif (DP). La population de thymocytes DP (composée de plusieurs millions de cellules) exprime donc une très grande diversité de TCR, lui permettant de reconnaître un très grand nombre d'antigènes différents. Cette population est qualifiée de polyclonale (multiples clones exprimant un TCR différent) et son répertoire TCR diversifié permet la reconnaissance d'une grande diversité d'antigènes. Cette très grande diversité du répertoire TCR est essentielle pour garantir la reconnaissance spécifique de n'importe quel antigène auquel l'organisme pourrait être confronté.

Les antigènes reconnus spécifiquement par le TCR se présentent sous forme de peptides d'environ 9 à 15 acides aminés en moyenne, chargés au niveau d'un sillon de liaison au peptide sur des molécules de CMH. On distingue deux catégories d'antigène reconnu par le TCR. Les antigènes du soi, provenant de protéines propres à l'organisme, et les antigènes du non soi, provenant d'agents pathogènes tels que les virus, bactéries et parasites mais également de cellules tumorales (on parle alors de soi modifié). Néanmoins, la reconnaissance de chacune de ces deux catégories d'antigène ne doit pas avoir la même conséquence sur le LT. En effet, la reconnaissance d'un antigène du non soi doit conduire à l'activation du LT et ainsi au déclenchement d'une réponse immunitaire adaptative. A l'inverse, même si la reconnaissance d'antigènes du soi est cruciale pour la survie des LT matures comme nous le verrons plus tard, cette reconnaissance ne doit pas conduire à l'activation du LT, sous peine de développement de pathologies auto-immunes. Pour cette raison, chaque thymocyte DP subit une étape de sélection thymique, véritable contrôle qualité de leur TCR nouvellement formé.

## 2. La sélection thymique

Le processus de sélection thymique est organisé en deux phases. La première phase, appelée sélection positive, a lieu au niveau du cortex thymique. Le but de cette étape de sélection positive est de conserver uniquement les thymocytes exprimant un TCR fonctionnel capable de reconnaître un antigène du soi associé à une molécule de CMH. En effet, tous les réarrangements conduisant à la formation d'un TCR ne sont pas productifs et de nombreux TCR formés ne sont ainsi pas capables de reconnaître spécifiquement les antigènes du soi. La sélection positive est réalisée par les cellules épithéliales thymiques corticales (cTEC) qui présentent aux thymocytes des antigènes du soi en association avec des molécules du CMH. La reconnaissance spécifique d'un complexe CMH/antigène du soi induit la génération d'un signal de survie pour les thymocytes. Ainsi, seuls les thymocytes possédant un TCR



**Figure 2 : Sélection thymique conservant uniquement les thymocytes capables de reconnaître les antigènes du soi tout en les tolérant.**

Graphique représentant l'évolution du nombre de thymocytes en fonction de leur réactivité contre des antigènes du soi. La majorité des thymocytes (aire bleue) possède une très faible réactivité vis à vis des antigènes du soi. Cette faible réactivité ne permet pas la réception de signaux de survie via le TCR. Ces thymocytes sont donc éliminés par négligence lors de la sélection positive. Parmi les thymocytes sélectionnés positivement, certains ont une réactivité très forte contre les antigènes du soi (aire rouge). Ces thymocytes dits auto-agressifs sont éliminés par sélection négative. Ainsi, seule une minorité de thymocytes (aire blanche) est conservée à l'issue du processus de sélection thymique. Ces thymocytes sont capables de reconnaître des antigènes du soi, mais cette reconnaissance ne délivre pas un signal TCR suffisamment fort pour activer ces cellules. On parle de tolérance centrale au soi.

fonctionnels survivront, les autres seront éliminés par apoptose. On parle de mort par négligence (**Figure 2**) (Surh, 1994; Klein et al., 2014). La fin de la phase de sélection positive est marquée par la down-régulation de l'un des deux co-récepteurs. La détermination du lignage adopté dépend entre autre de la molécule de CMH reconnu par le TCR du thymocyte. Il existe deux classes de CMH : le CMH-I, exprimé par toutes les cellules nucléées de l'organisme, et le CMH-II, exprimé uniquement par un petit groupe de cellules, appelées cellules présentatrices d'antigène (APC) dont font partie les cTEC. Ainsi, les thymocytes reconnaissant des complexes CMH-II/antigène du soi expriment le co récepteur CD4 (on parle alors de stade de différenciation simple positif (SP)) tandis que les thymocytes reconnaissant des complexes CMH-I/antigène du soi expriment le co récepteur CD8. La fixation du lignage CD4 ou CD8 est un phénomène complexe régulé par la durée du signal TCR, l'expression différentielle de nombreux facteurs de transcription, tels que Runx3, Th-POK, TOX, Gata 3, ainsi que des signaux environnementaux, tels que le signal délivré par l'interleukine 7 (IL-7) (Singer et al., 2008).

En plus de sélectionner uniquement les thymocytes possédant un TCR fonctionnel capable de reconnaître un complexe CMH-antigène du soi, le système immunitaire doit également éliminer les thymocytes dit auto-agressifs dont le TCR possède une haute affinité pour les complexes CMH/antigène du soi (**Figure 2**). En effet, l'engagement du TCR de LT auto-agressifs matures par un complexe CMH/antigène du soi conduirait à l'activation de ces cellules et au développement de pathologies auto-immunes. Ainsi, les thymocytes SP sélectionnés positivement migrent vers la zone médullaire du thymus pour subir l'étape de sélection négative, également appelée tolérance centrale. Au cours de ce processus, de très nombreux antigènes du soi associés à des molécules de CMH-I et II seront présentés aux thymocytes par différentes populations d'APC notamment les cellules épithéliales thymiques médullaires (mTEC) et les cellules dendritiques (DC). Ces populations cellulaires thymiques présentent la particularité d'exprimer des antigènes du soi dont l'expression est normalement restreinte à d'autres tissus. Il a été démontré que l'expression de ces tissue restricted antigen (TRA) par les mTEC dépend du facteur de transcription autoimmune regulator (AIRE), induisant la transcription de gènes normalement inhibés (Yin and Steitz, 2002). Plusieurs études suggèrent que la présentation de TRA par les DC est permise par le transfert de ces antigènes depuis les mTEC (Millet et al., 2008; Koble and Kyewski, 2009).

Au cours de la sélection négative, la majorité des thymocytes SP reconnaissant les complexes CMH/antigène du soi avec une forte affinité seront éliminés par apoptose ; on parle de délétion clonale (**Figure 2**) (Klein et al., 2014; Kisielow et al., 1988; Kappler et al., 1987). A l'inverse, les thymocytes SP reconnaissant ces complexes CMH/antigène du soi



		Expression	
Marqueurs	Fonction	LT CD8 naïf	LT CD8 mémoire
CD44	Récepteur de l'acide hyaluronique	lo	hi
CXCR3	Récepteur des chimiokines CXCL9/10/11	lo	hi
CD122	Chaîne $\beta$ du récepteur à l'IL-2 et à l'IL-15	lo	hi
Ly6C	Glycoprotéine à ancre GPI	lo	hi
CD62L	L-sélectine	+	+/-
LFA1	Intégrine	+	++
CCR5	Récepteur des chimiokines CCL3/4/5	-	+
CD127	Chaîne $\alpha$ du récepteur à l'IL-7	hi	hi

**Tableau 1 : Principaux marqueurs mémoires.**

Tableau présentant une liste non exhaustive des principaux marqueurs phénotypiques utilisés pour distinguer les LT CD8 mémoires des LT CD8 naïfs (- : absence d'expression, + : expression). Pour un certain nombre de ces marqueurs, c'est le niveau d'expression (lo : faible, hi : forte) qui permet de distinguer les populations de LT CD8.

avec une faible affinité survivent et quittent le thymus pour rejoindre les organes lymphoïdes secondaires. Ces cellules se différencient alors en LT CD4 ou CD8 matures (Hogquist et al., 2015). Il est important de noter que le processus de sélection négative est malgré tout imparfait. En effet, certains thymocytes potentiellement auto-agressifs ne sont pas éliminés et se différencient en LT matures en périphérie. Ainsi, un processus de tolérance périphérique est mis en place par le système immunitaire afin de prévenir le développement de pathologies auto-immunes. Cette tolérance périphérique est entre autre assurée par les LT régulateurs (LTreg). Plusieurs sous-populations de LTreg ont été identifiées :

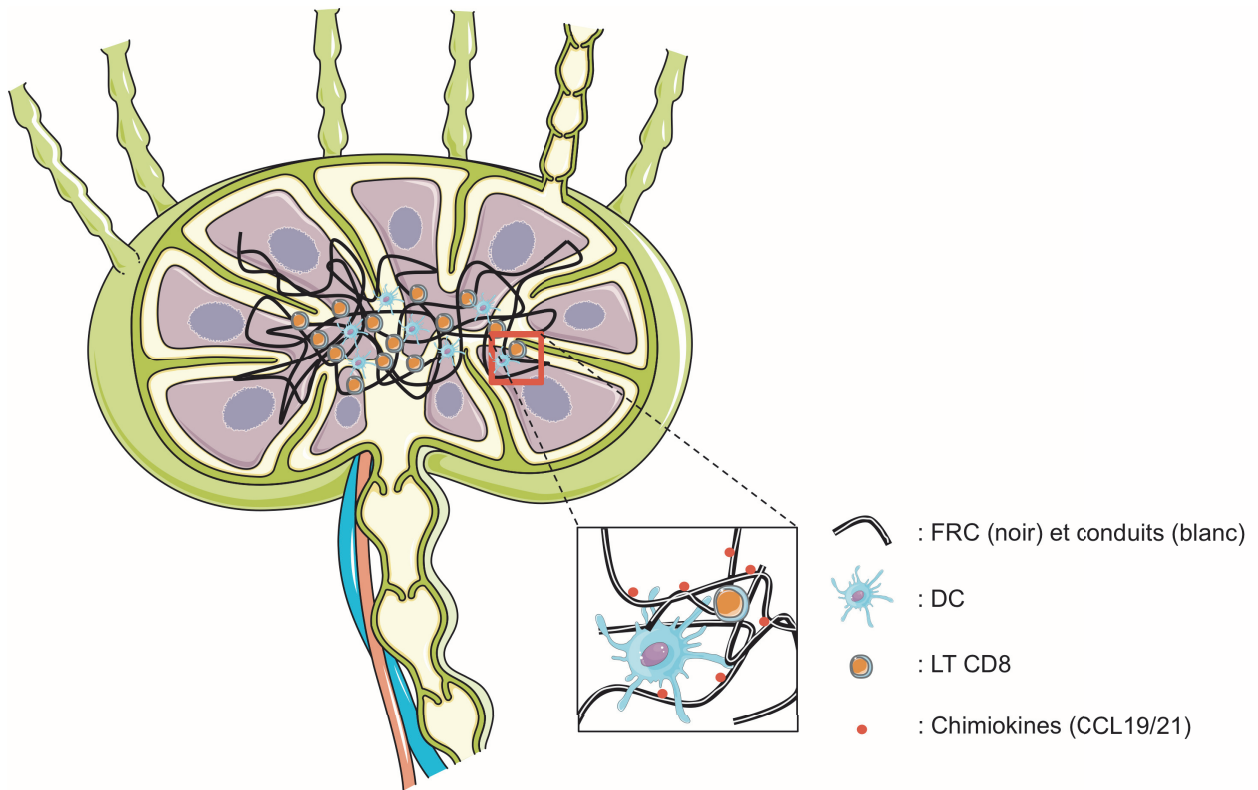
- Les LTreg CD4, caractérisés par l'expression du facteur de transcription FoxP3 et la chaîne  $\alpha$  du récepteur à l'IL-2 (CD25). Au sein de cette population, on distingue les LTreg naturels, générés au niveau du thymus lors de la sélection négative, et les LTreg induits, générés en périphérie via une stimulation du TCR associée à une stimulation par l'IL-2 et le TGF $\beta$  (Curotto de Lafaille and Lafaille, 2009).
- Les LTreg CD8, caractérisés par l'expression de la chaîne  $\beta$  du récepteur à l'IL-15 (CD122) et des récepteurs inhibiteurs Ly49. Les mécanismes contrôlant la génération de ces cellules demeurent cependant inconnus (Kim et al., 2011; Liu et al., 2015).

Les fonctions immunosuppressives des LTreg impliquent différents mécanismes, utilisant notamment la sécrétion de cytokines anti-inflammatoires, l'expression de molécules de costimulation inhibitrices et l'élimination de cellules immunitaires par cytotoxicité. Ces différents mécanismes ne seront pas développés au cours de cette introduction.

Les LT matures émigrant du thymus sont dits naïfs, car ils n'ont jamais été en contact avec les antigènes du non soi dont leur TCR est spécifique. Nous verrons plus tard que cette définition est cependant quelque peu erronée, puisque certains LT CD8 mémoires sont générés sans avoir été en contact avec les antigènes du non soi dont ils sont spécifiques. Ainsi, l'état naïf d'un LT CD8 est davantage lié à un phénotype caractéristique ainsi qu'à l'absence de fonctions améliorées spécifiques permettant aisément de les distinguer des LT CD8 mémoires (**Tableau 1**) (Veiga-Fernandes et al., 2000).

## **B. Localisation**

Lorsqu'ils émigrent du thymus, les LT CD8 naïfs se localisent au niveau des organes lymphoïdes secondaires (OLS), tels que la rate, les ganglions lymphatiques et les plaques de Peyer (au niveau de l'intestin). Blattman et collègues ont pu mettre en évidence que parmi la



**Figure 3 : Migration ordonnée des LT CD8 naïfs au sein des ganglions lymphatiques.**

Au sein d'un ganglion lymphatique, les LT CD8 naïfs migrent le long de conduits lymphatiques enveloppés de FRC (Fibroblastic Reticular Cells). Cette migration le long de ces conduits s'explique notamment par la présence des chimiokines CCL19/21 sur ces structures. Des DC portant des antigènes associés au CMH-I sont enchâssées dans ce réseau de conduits. Ainsi, cette structure particulière permet aux LT CD8 naïfs de scanner rapidement et efficacement un grand nombre de DC, augmentant ainsi la probabilité d'identifier celles portant les antigènes dérivés de pathogènes dont ils sont spécifiques.

population de LT CD8 présente chez des souris naïves (c'est à dire n'ayant jamais été immunisées ou infectées délibérément par un pathogène), seules 200 cellules possèdent un TCR spécifique de l'antigène GP33 du virus de la chorio méningite (LCMV) (Blattman et al., 2002). Ainsi, la localisation anatomique particulière de ces cellules permet d'augmenter considérablement la probabilité de rencontre entre un antigène du non soi et les rares LT CD8 naïfs portant le TCR spécifique de cet antigène (Lämmermann and Sixt, 2008).

Les LT CD8 naïfs expriment un certain nombre de molécules permettant leur entrée dans les OLS. L'expression du récepteur de chimiokine CCR7 permet aux LT CD8 naïfs de migrer contre des gradients des chimiokines CCL19 et CCL21. Ces deux chimiokines sont retrouvées en abondance notamment au niveau des ganglions lymphatiques où elles sont produites par les cellules stromales, mais également au niveau du lumen des HEV (High Endothelial Venules), porte d'entrée des lymphocytes dans les ganglions lymphatiques (Bromley et al., 2008). Associé à l'expression de molécules d'adhésion, telles que la L-selectine et certaines intégrines, notamment l'intégrine LFA1, ces molécules de homing permettent aux LT CD8 naïfs de traverser l'endothélium des HEV par diapédèse et ainsi d'accéder au ganglions lymphatiques (Andrian and Mackay, 2000).

Les LT CD8 naïfs ne résident pas dans un OLS en particulier. En effet, ils circulent en permanence entre les différents OLS via le système lymphatique et sanguin. De même, au sein d'un OLS, les LT CD8 naïfs ne demeurent pas statiques. Au contraire, afin d'augmenter la probabilité de rencontre avec les antigènes du non soi dont ils sont spécifiques, les LT CD8 naïfs sont extrêmement mobiles, effectuant des nombreux mouvements rapides (10  $\mu\text{m}/\text{min}$ ) longtemps considérés comme aléatoires. La technologie de la microscopie intravitale a néanmoins permis d'invalider cette hypothèse, démontrant que cette migration est parfaitement organisée. En effet, l'étude de Bajénoff et collègues démontre très clairement que les LT CD8 naïfs se déplacent le long de conduits lymphatiques enveloppés de cellules stromales, notamment des fibroblastes réticulés (Bajénoff et al., 2006). Ces cellules stromales produisent les chimiokines CCL19 et CCL21, créant ainsi une importante chémo attraction pour les LT CD8 naïfs qui se servent alors de ces conduits lymphatiques comme de véritables rails (Bromley et al., 2008). En parcourant ce réseau de conduits au sein de l'OLS, la probabilité qu'un LT CD8 rencontre un des antigènes dont il est spécifique est grandement augmentée (**Figure 3**) (Mempel et al., 2006). En effet, des études démontrent qu'entre les interstices de ces conduits sont localisées des DC qui sont chargées de présenter des complexes CMH-I/antigène aux LT CD8 naïfs (Lindquist et al., 2004). A l'état d'homéostasie, ces cellules sont relativement peu mobiles par rapport aux LT (de 3 à 5  $\mu\text{m}/\text{min}$ ) et interagissent en moyenne avec 500 à 4500 LT en 1h (Bousso and Robey, 2003;

Miller et al., 2004). Ainsi, le mode de circulation des LT CD8 naïfs leur permet de « scanner » très rapidement un très grand nombre de DC afin d'identifier celles portant les antigènes du non soi dont ils sont spécifiques.

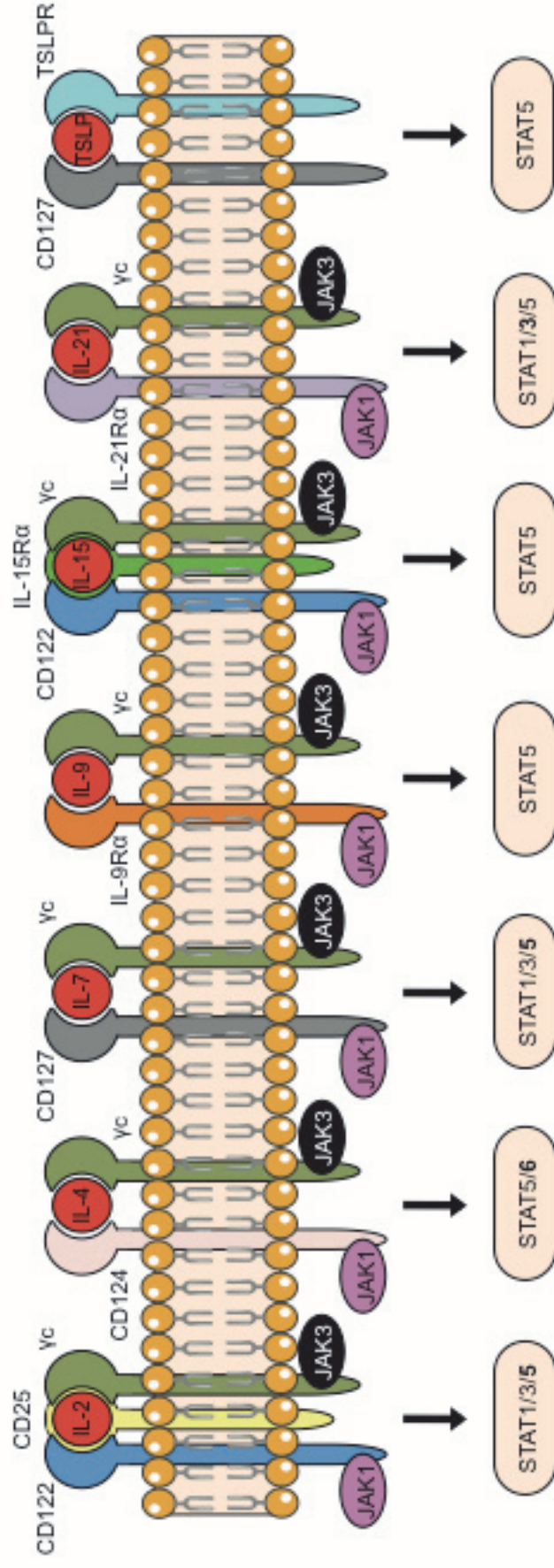
## **C. Survie**

La survie des LT naïfs est une question qui a été abordée par de nombreuses études. Deux grands types de signaux sont essentiels pour garantir leur maintien.

### **1. Le signal TCR**

Comme nous l'avons vu précédemment, la reconnaissance de complexes CMH/antigène du soi par les thymocytes est essentielle pour induire un signal de survie au sein de ces cellules. La nécessité de telles interactions hors du thymus pour la survie des LT naïfs fut déterminée notamment par le transfert de ces cellules dans des souris déficientes pour les molécules de CMH ou exprimant un haplotype de CMH différent de celui utilisé pour la sélection positive. Ces études ont démontré que dans de telles conditions, les LT naïfs disparaissent rapidement de l'organisme, suggérant que la survie de ces cellules dépend de la réception d'un signal TCR (Tanchot, 1997; Kirberg et al., 1997; Rooke et al., 1997; Murali-Krishna et al., 1999; Witherden et al., 2000). Cette hypothèse est notamment soutenue par l'étude de Witherden et collègues qui démontre qu'en absence de molécules de CMH-II, les LT CD4 naïfs présentent un niveau plus faible de phosphorylation de certaines protéines de signalisation en aval du TCR (Witherden et al., 2000). De même, Seddon et collègues démontrent que l'inactivation des kinases Lck et Fyn associées au complexe TCR conduit à l'élimination progressive des LT CD8 naïfs (**Figure 6**) (Seddon and Zamoyska, 2002). Ainsi, même si la reconnaissance de complexes CMH-I/antigène du soi n'induit pas un signal suffisant à l'activation des LT CD8 naïfs (grâce au processus de tolérance centrale), elle génère un signal TCR crucial pour la survie de ces cellules (Sprent et al., 2008).

### **2. Le signal cytokinique**



**Figure 4 : Récepteurs des cytokines de la famille  $\gamma c$ .**

Les récepteurs des cytokines  $\gamma c$  (excepté le récepteur du TSLP) présentent la particularité d'utiliser une chaîne  $\gamma c$  commune. Cette chaîne est généralement associée à une chaîne  $\alpha$ , sauf pour les récepteurs à l'IL-2 et à l'IL-15 qui possèdent en plus une chaîne  $\beta$  commune (CD122). L'engagement de ces récepteurs par leur cytokine conduit à l'activation des kinases JAK1/3 (excepté pour le récepteur du TSLP) et des facteurs de transcription STAT. Lorsque plusieurs STAT peuvent être activés, le principal facteur de transcription est indiqué en gras.

Les cytokines jouent un rôle prépondérant dans le fonctionnement du système immunitaire. Parmi les différentes cytokines produites au sein de l'organisme, les cytokines appartenant à la famille  $\gamma_c$  régulent très finement la biologie des LT CD8. Cette famille de cytokine comporte 7 membres (IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15, IL-21 et TSLP) et les récepteurs de ces cytokines possèdent la particularité d'utiliser une chaîne  $\gamma_c$  (CD132) commune, d'où le nom attribué à cette famille (**Figure 4**) (Rochman et al., 2009). Le signal transmis via ces récepteurs de cytokine active les kinases Janus kinases 1 et 3 (JAK1 et JAK3) ainsi que les facteurs de transcription STAT (Signal Transducer and Activator of Transcription). Parmi les cytokines  $\gamma_c$ , l'IL-7 a été identifiée comme un membre essentiel pour la survie des LT CD8 naïfs. En effet, des LT CD8 naïfs déficients pour le récepteur à l'IL-7 sont rapidement éliminés de l'organisme (Tan et al., 2001; Schluns, 2000). Cette cytokine est produite de manière constante par les cellules stromales des OLS. L'engagement du récepteur de cette cytokine à la surface des LT CD8 conduit entre autre à l'expression des gènes codant pour les protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Mcl-1, favorisant ainsi la survie cellulaire (Mazzucchelli and Durum, 2007; Schluns, 2000).

## **Conclusion I**

Au cours de cette première partie, nous avons vu que la moelle osseuse et surtout le thymus sont essentiels à la génération des LT CD8 naïfs fonctionnels. Ces cellules, aisément reconnaissables par leur phénotype, constituent une population polyclonale capable de reconnaître et de réagir spécifiquement contre une très grande diversité d'antigène du non soi tout en tolérant les antigènes du soi. Les LT CD8 naïfs sont maintenus à l'état quiescent dans les OLS où ils reçoivent les signaux adéquats pour leur survie. Ces cellules sont très mobiles, scannant un très grand nombre de DC dans les différents OLS afin d'augmenter la probabilité de rencontrer les antigènes du non soi dont elles sont spécifiques. Dans la suite de cette introduction, nous allons voir qu'en fonction des signaux reçus par les LT CD8 naïfs, différentes classes de LT CD8 mémoires vont être générées.

## **II. Les LT CD8 mémoires conventionnels**

Lors d'une première infection par un pathogène, les LT CD8 naïfs spécifiques d'antigènes provenant de cet agent pathogène vont être activés, déclenchant ainsi la réponse



Noms	Spécificité du TCR utilisé	Haplotype de CMH-I reconnu	Segments V réarrangés	Références
OTI	OVA <sub>257-264</sub>	H-2K <sup>b</sup>	Vα2 ; Vβ5	(Hogquist et al., 1994)
F5	NP <sub>366-374</sub>	H-2D <sup>b</sup>	Vα4 ; Vβ11	(Mamalaki et al., 1993)
P14	GP <sub>33-41</sub>	H-2D <sup>b</sup>	Vα2 ; Vβ8.1	(Pircher et al., 1989)
2C	H-2L <sup>d</sup>	H-2D <sup>b</sup>	Vβ8	(Sha et al., 1988)
H-Y	H-Y	H-2D <sup>b</sup>	Vβ8.2	(Kisielow et al., 1988)

**Tableau 2 : Principales lignées de LT CD8 transgéniques pour le TCR.**

Tableau présentant une liste non exhaustive des principales lignées murines transgéniques pour un TCR restreint au CMH-I d'haplotype H-2<sup>b</sup>.



immunitaire adaptative primaire. Ces cellules activées vont proliférer très fortement et se différencier en LT CD8 effecteurs, capables de reconnaître et d'éliminer les cellules infectées. A l'issue de cette réponse immunitaire primaire, une population de LT CD8 mémoires conventionnels est générée. Ces cellules persisteront très longtemps dans l'organisme et, lors d'une seconde infection par le même pathogène, seront capable de produire une réponse immunitaire secondaire plus rapide et plus efficace.

### **A. Les modèles de LT CD8 transgéniques pour le TCR**

Le grand intérêt de la communauté scientifique pour la sélection thymique a conduit à la génération de modèles de souris transgéniques pour le TCR afin de mieux comprendre ce mécanisme. L'expression forcée de transgènes codant pour les chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  du TCR combinée à l'inactivation des recombinaisons RAG conduit à l'expression d'un seul TCR de spécificité antigénique connue. Ainsi, la population de LT CD8 naïfs au sein de ces souris présente la particularité d'être monoclonale (une seule spécificité antigénique). De nombreuses lignées de LT CD8 transgéniques pour le TCR, de spécificité antigénique connue, ont ainsi été générées (**Tableau 2**). Si ces modèles TCR transgéniques se sont révélés particulièrement utiles pour la compréhension du mécanisme de sélection thymique, leur utilisation a également facilité l'étude de la mémoire immunitaire T CD8.

Comme nous l'avons vu précédemment, dans un contexte physiologique, la population de LT CD8 est polyclonale. Au sein de cette population, le nombre de cellules exprimant le TCR spécifique d'un antigène du non soi donné est particulièrement faible ( $\approx 200$  cellules spécifique de l'antigène GP33 du virus LCMV par exemple) (Blattman et al., 2002). Cette fréquence très faible rend particulièrement difficile le suivi des réponses immunitaires précoces T CD8 spécifiques d'un antigène donné. Pour pallier à ce problème, des expériences de transfert adoptif de LT CD8 naïfs transgéniques pour le TCR dans des souris polyclonales ont très largement été utilisées. En immunisant l'hôte avec un pathogène recombinant exprimant l'antigène modèle dont les LT CD8 transgéniques pour le TCR sont spécifiques, ces cellules transférées se différencient en LT CD8 mémoires conventionnels, aisément identifiables par l'utilisation de marqueurs allotypiques différents. Néanmoins, ces expériences de transfert adoptif furent sujettes à d'importants débats, notamment sur la physiologie de la réponse T CD8 générée. L'étude de Marzo et collègues révèle en effet que le phénotype de la population de LT CD8 mémoires spécifique d'un antigène donné dépend grandement de la fréquence initiale de LT CD8 naïfs spécifiques de cet antigène (Marzo et al.,

2005). A l'inverse, l'étude de Munitic et collègues démontre qu'une fréquence élevée de LT CD8 TCR transgéniques ne modifie pas la réponse de l'hôte contre le LCMV (Munitic et al., 2009).

## **B. Génération**

### **1. Activation des LT CD8 naïfs**

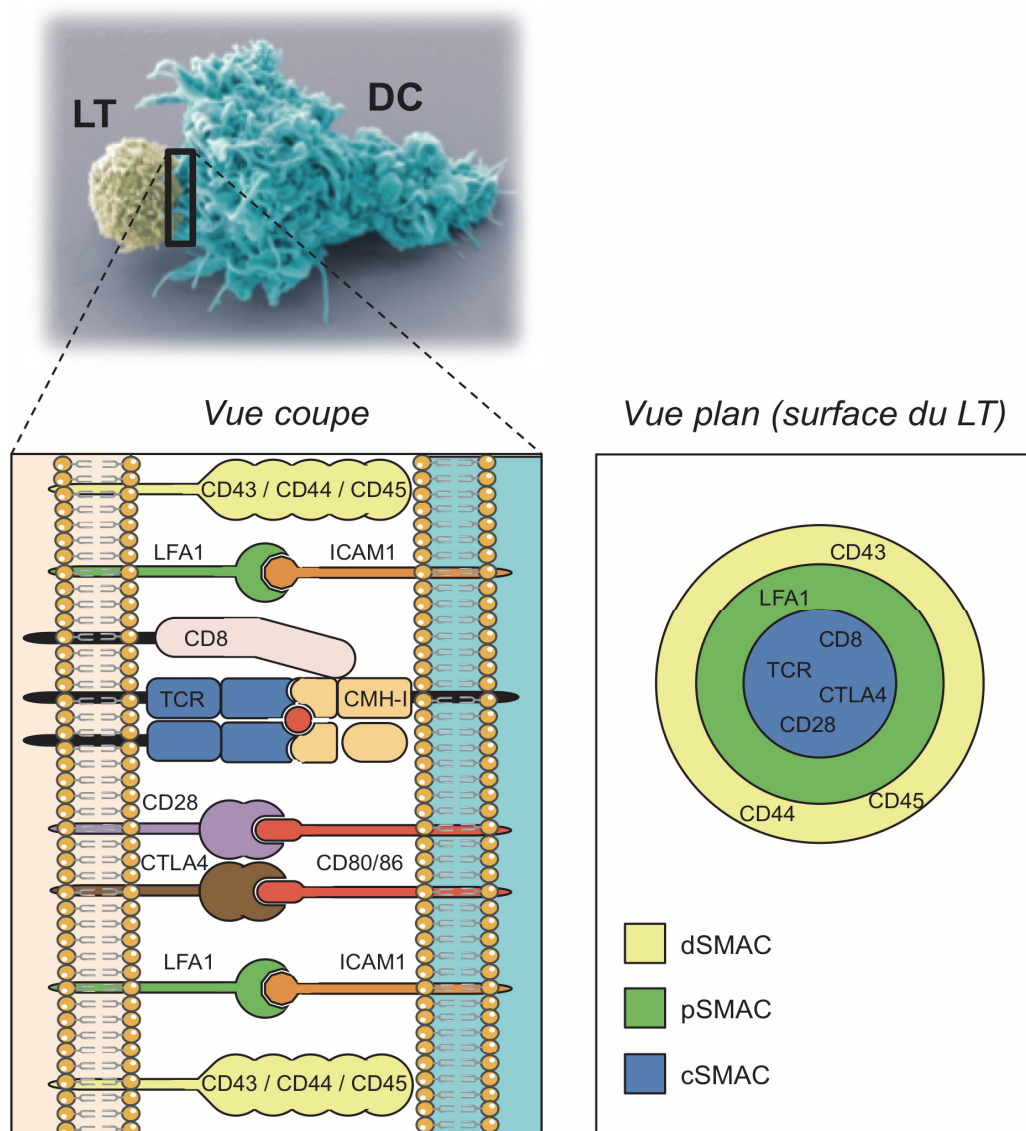
#### **a) Interaction avec les DC**

Même si toutes les cellules nucléées de l'organisme sont capables de présenter des complexes CMH-I/antigène du non soi aux LT CD8 naïfs, seules les DC possèdent les signaux nécessaires à l'activation complète de ces cellules (Jung et al., 2002; Sigal et al., 1999). Pour cette raison, les DC sont qualifiées d'APC professionnelles. Chez la souris, au moins 6 sous-populations de DC ont été identifiées. On distingue notamment les DC migratoires, localisées dans les tissus périphériques, et les DC résidentes des OLS. Parmi l'ensemble de ces sous-populations de DC, il a été mis en évidence par plusieurs études dans un certain nombre de contextes infectieux que la présentation d'antigènes du non soi par les DC CD8 $\alpha$ + résidentes des ganglions lymphatiques induits l'activation des LT CD8 naïfs (Allan et al., 2003; Belz et al., 2004; Allan et al., 2006). Néanmoins, l'absence d'activation des LT CD8 observée lorsque la migration des DC migratoires est inhibée suggère un rôle indirect mais essentiel de cette population de DC dans le processus d'activation des LT CD8 naïfs. Ainsi, les DC migratoires prennent en charge l'antigène au niveau des tissus périphériques, migrent jusqu'au ganglion lymphatique drainant où les DC CD8 $\alpha$ + résidentes prennent à leur tour en charge l'antigène pour le présenter aux LT CD8 naïfs (Allan et al., 2006).

Il existe deux voies distinctes de présentation de l'antigène aux LT CD8. La présentation directe d'antigènes via le CMH-I permet de présenter aux LT CD8 naïfs des antigènes endogènes à l'APC. Ces antigènes endogènes sont dégradés via le protéasome, puis transportés au niveau du réticulum endoplasmique par le transporteur TAP (Transporter associated with Antigen Processing) où ils sont associés à une molécule de CMH-I qui sera ensuite exportée à la surface cellulaire via l'appareil de Golgi. Dans un contexte infectieux, cette voie est utilisée lorsque la DC elle-même est infectée par un pathogène intracellulaire. A l'inverse, lorsque les DC ne sont pas elles-mêmes infectées, la présentation croisée d'antigènes via le CMH-I leur permet de présenter aux LT CD8 naïfs des antigènes d'origine exogène

(Joffre et al., 2012). Ces antigènes proviennent généralement de débris cellulaires (cellules infectées par le pathogène) phagocytés par les DC. Ces antigènes sont alors exportés dans le cytosol où ils sont dégradés par le protéasome en petits fragments peptidiques. Le transporteur TAP permet le transport de ces fragments antigéniques au niveau du réticulum endoplasmique, où ils sont chargés sur des molécules de CMH-I. Ces complexes CMH-I/antigène sont alors transportés au niveau de la membrane plasmique. On parle de chargement du CMH-I via le réticulum endoplasmique. Les fragments antigéniques produits par le protéasome peuvent également être chargés sur une molécule de CMH-I directement au niveau du phagosome. Le transporteur TAP localisé au niveau de ce phagosome permet le transport de ces fragments antigéniques dans ce compartiment. Ces antigènes sont alors chargés sur une molécule de CMH-I, qui est ensuite transportée au niveau de la membrane plasmique. On parle alors de chargement du CMH-I via le phagosome. Il est important de noter que parmi les différentes sous-populations de DC, les DC CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> sont les plus efficaces pour effectuer la présentation croisée d'antigènes associés au CMH-I (Haan et al., 2000; Pooley et al., 2001). L'utilisation de l'une ou l'autre de ces voies de présentation de l'antigène pour activer les LT CD8 naïfs dépend de nombreux paramètres, notamment du tropisme du pathogène infectant l'organisme, de la voie d'immunisation ainsi que de la quantité de pathogène (Sigal et al., 1999; Hickman et al., 2008).

L'interaction au niveau des ganglions lymphatiques entre des LT CD8 naïfs et des DC présentant l'antigène dont ils sont spécifiques en association avec le CMH-I est un processus complexe, organisé en trois phases, décrites par Mempel et collègues (Mempel et al., 2004). Durant la première phase, les LT CD8 naïfs effectuent de nombreux contacts transitoires (5min) avec les DC présentant l'antigène. Durant la seconde phase, la vitesse de migration des LT CD8 naïfs diminue très fortement et ces derniers effectuent alors des contacts prolongés (1h ou plus) avec les DC, aboutissant à l'expression de certains marqueurs d'activation et à la production de certaines cytokines, notamment l'IL-2, par les LT CD8. Enfin, lors de la troisième phase de cette interaction, les LT CD8 établissent à nouveau des contacts transitoires avec les DC, réacquièrent une vitesse de migration importante et prolifèrent fortement (Mempel et al., 2004). Ce processus d'interaction en trois phases est essentiel à l'activation complète des LT CD8 naïfs et ainsi au développement de réponses immunitaires T CD8 efficaces. En effet, l'étude de Henrickson et collègues, utilisant un modèle *in vivo* dans lequel ils contrôlent la quantité d'antigène disponible, démontre que l'absence de phase 2 lors des contacts entre LT CD8 naïfs et DC conduit à la génération d'une réponse T CD8 incomplète, ne générant qu'un très faible nombre de LT CD8 mémoires (Henrickson et al., 2013).



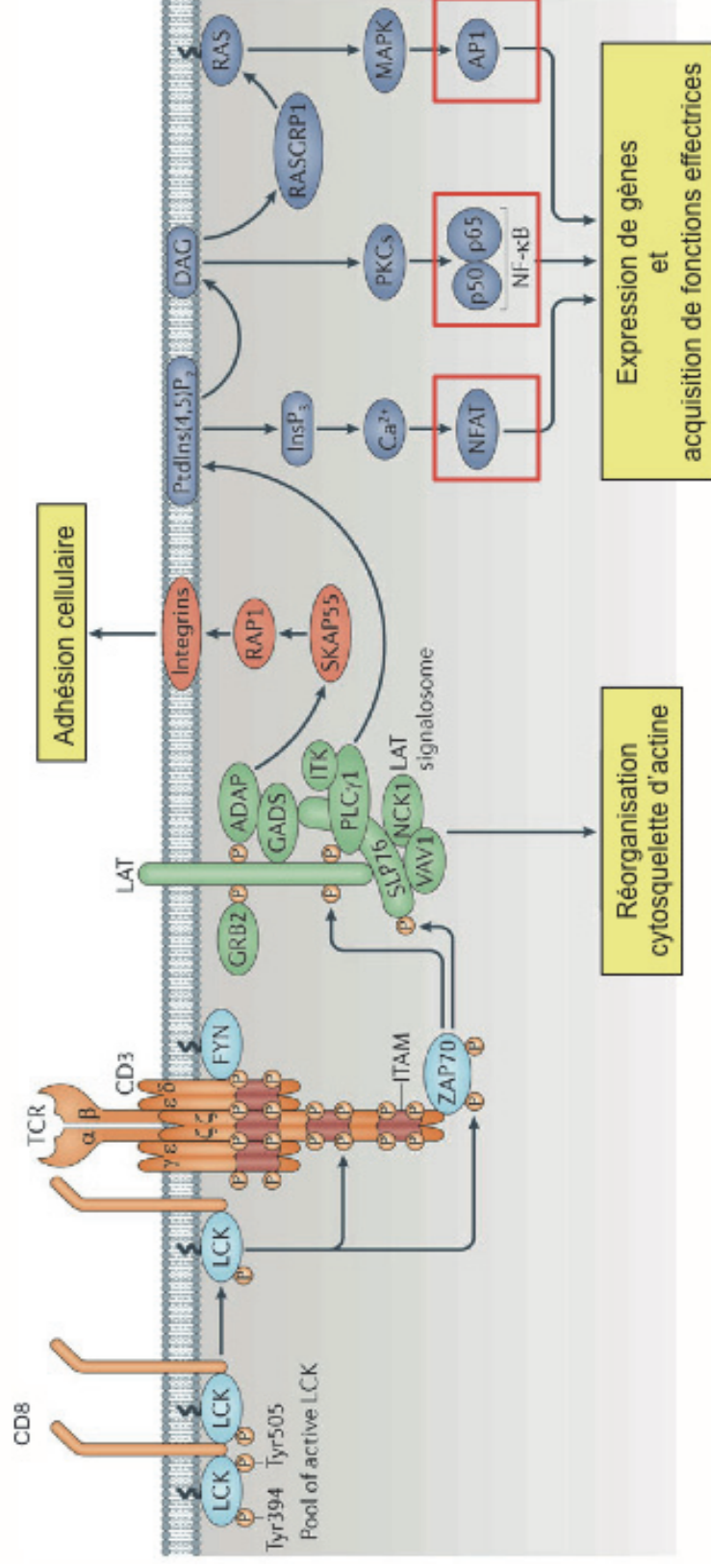
**Figure 5 : La synapse immunitaire.**

L'interaction entre un LT CD8 et une DC présentant l'antigène conduit à la formation d'une synapse immunitaire. La vue coupe permet d'observer l'interaction des différents composants de la synapse immunitaire. La vue plan permet d'observer la répartition des différents composants de la synapse immunitaire à la surface du LT CD8. Une image symétrique est présente à la surface de la DC (non montrée). La synapse immunitaire est organisée en anneaux appelés SMAC (Supra Molecular Activation Cluster) (Vue coupe). En position centrale, on observe le SMAC central (cSMAC). Cette structure est formée par le regroupement des TCR et co-récepteurs CD8 liant les complexes CMH-I/antigène (Vue plan). On retrouve également au niveau du cSMAC les récepteurs de costimulation CD28 et CTLA4 liant les molécules CD80/86. Le SMAC périphérique (pSMAC) s'établit autour du cSMAC. Cette structure est formée par le regroupement des intégrines LFA1 liant leur ligand ICAM1. Enfin, le SMAC distal (dSMAC) se trouve autour du pSMAC et est formé par le regroupement de protéines de grande taille telles que CD43, CD44 et CD45.

La zone de contact entre le LT CD8 et la DC, appelée synapse immunitaire, est une zone structurellement très organisée. Monks et collègues présentent pour la première fois en 1998 la structure en forme d'anneaux de la synapse immunitaire, résultant de la réorganisation de la membrane plasmique du LT et de la DC (**Figure 5**). Ils définissent alors différentes régions au sein de cette structure, appelées SMACs (Supra Molecular Activation Clusters). Au niveau de la membrane plasmique, on distingue ainsi le SMAC central (cSMAC), contenant différents récepteurs essentiels à l'activation du LT CD8, notamment les complexes TCR-CMH/antigène, et le SMAC périphérique (pSMAC) contenant des molécules d'adhésion, notamment l'intégrine LFA1 liée à son ligand ICAM1 (**Figure 5**) (Monks et al., 1998). Une troisième région périphérique aux deux premières a également été caractérisée au sein de la synapse immunitaire. Cette région, nommée le SMAC distal (dSMAC), contient certaines protéines de grande taille, notamment la leucosialine (CD43) ainsi que la phosphatase CD45. La localisation distale de ces protéines de grande taille apparaît comme étant essentielle pour l'activation des LT, leur encombrement stérique important gênant probablement l'interaction entre le TCR et le complexe CMH/antigène. En effet, un défaut de relocalisation de CD43 au niveau du dSMAC entraîne une activation incomplète des LT (Delon et al., 2001) (**Figure 5**).

La dynamique d'établissement de la synapse immunitaire a été largement étudiée. En utilisant un modèle *in vitro* de bicouche lipidique contenant des complexes CMH/antigène et des protéines ICAM1 marqués, Grakoui et collègues ont mis en évidence que les interactions précoces entre les complexes CMH/antigène et les TCR sont d'abord localisées de manière diffuse à la surface de la membrane plasmique tandis que la DC et le LT interagissent fortement grâce à la liaison de LFA1 avec ICAM1 (Grakoui et al., 1999). Bien que l'établissement de la synapse immunitaire ait longtemps été considéré comme le point de départ de l'activation des LT, notamment de part le recrutement de nombreuses molécules de signalisation au niveau du cSMAC, la cinétique d'apparition de cette structure (5 à 10 min) ne coïncide pas complètement avec celle de l'apparition des premiers signes d'activation dans les LT (Saito et al., 2010). Ainsi, il a été mis en évidence que les microclusters de complexes TCR-CMH/antigène formés immédiatement après engagement du TCR (< 1 min) et donc préalablement à l'établissement de la synapse immunitaire, sont, au moins en partie, responsables de l'activation des LT. En effet, Yokosuka et collègues démontrent que c'est au niveau de ces microclusters que sont localisées les formes activées de certaines protéines de transduction du signal, notamment Zap70 et SLP-76, impliquées dans la cascade de signalisation du TCR (Yokosuka et al., 2005). La formation de la synapse immunitaire est





**Figure 6 : Principales voies de signalisations activées par engagement fort du TCR.**

L'engagement fort du TCR par un complexe CMH-I/antigène dont il est spécifique conduit à la phosphorylation des motifs ITAM du complexe CD3 par les kinases LCK et Fyn. ZAP70 reconnaît et se fixe sur ces ITAM phosphorylés et est activé par LCK via une phosphorylation. ZAP70 phosphoryle alors LAT et SLP76, qui forment alors un complexe recrutant et activant la PLCγ1. Ce complexe permet d'induire une réorganisation du cytosquelette d'actine, via Vav1 et NCK1, et augmente l'adhésion cellulaire via ADAP. La PLCγ1 clive le phosphatidylinositol diphosphate (PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>) en diacylglycérol (DAG) et inositol triphosphate (InsP<sub>3</sub>). L'inositol triphosphate permet d'augmenter la concentration de calcium (Ca<sup>2+</sup>) intracellulaire, conduisant à l'activation du facteur de transcription NFAT. Le diacylglycérol active la PKCθ et la voie des MAP kinases (MAPK), conduisant respectivement à l'activation des facteurs de transcription NFκB et AP1. Les facteurs de transcription NFAT, NFκB et AP1 (entourés en rouge) sont essentiels pour induire l'expression de gènes impliqués dans la prolifération, la différenciation et les fonctions effectrices. Schéma modifié d'après (Brownlie and Zamoyska, 2013).

donc un processus actif très finement régulé suite à la transmission de différents signaux aux LT CD8 naïfs.

### b) 3 signaux nécessaires à l'activation

Plusieurs points de contrôle (signal TCR, signal de costimulation, signal cytokinique) régulent l'activation des LT CD8 naïfs. C'est la réception des signaux permettant le passage de ces points de contrôle qui conduira à l'activation des LT CD8 naïfs.

- Le signal TCR

L'engagement du TCR par un complexe CMH-I/antigène du non-soi conduit au 1<sup>er</sup> signal essentiel à l'activation d'un LT CD8 naïf. Le co-recépteur CD8 interagit avec un domaine non polymorphe du CMH-I afin de stabiliser l'interaction entre la DC et le LT CD8 naïf. La transduction du signal induit par reconnaissance de l'antigène est assurée par le complexe CD3. Ce complexe moléculaire formé de 6 chaînes polypeptidiques (2 chaînes  $\epsilon$ , 1 chaîne  $\gamma$ , 1 chaîne  $\delta$  et 2 chaînes  $\zeta$ ) est associé de manière non covalente à l'hétérodimère  $\alpha\beta$  du TCR (**Figure 6**). Chaque chaîne du complexe CD3 possède une queue intra-cytoplasmique sur laquelle sont positionnés des motifs ITAMs (Immuno receptor Tyrosine-based Activation Motif) comportant des résidus tyrosines phosphorylables par certaines tyrosine-kinases de la famille Src associées au complexe TCR, notamment Fyn et Lck. La phosphorylation des motifs ITAM suite à l'engagement du TCR par le complexe CMH-I/antigène constitue le point de départ d'une importante cascade de signalisation, dépendante de la mobilisation de calcium intracellulaire. A l'issue de cette cascade de signalisation, trois principaux facteurs de transcription sont activés : NF- $\kappa$ B (Nuclear Factor Kappa B), NFAT (Nuclear Factor of Activated T cells) et AP-1 (Activator Protein 1). L'activation de ces trois facteurs de transcription permet l'induction d'un programme génétique menant à la prolifération et à la différenciation en cellule effectrice (**Figure 6**).

De nombreuses études rapportent que la durée ainsi que la force du signal TCR influent sur la réponse primaire des LT CD8. Iezzi et collègues démontrent en 1998 que l'induction de la prolifération de LT naïfs nécessite une stimulation du TCR durant 20h (Iezzi et al., 1998). Cette observation corrèle avec l'étude de Mempel et collègues, démontrant *in*

*in vivo* que les LT CD8 naïfs effectuent des contacts avec les DC durant environ 20h avant de commencer à proliférer (Mempel et al., 2004). Afin d'étudier l'impact de la durée du signal TCR sur l'activation des LT CD8 naïfs, Prlic et collègues utilisent des injections *in vivo* de DC, transgéniques pour le récepteur à la toxine diphtérique, chargées avec un peptide antigénique. L'injection de toxine diphtérique permet de contrôler précisément la durée du signal TCR reçu par les LT CD8 spécifiques de l'antigène. Ils démontrent ainsi qu'une courte durée de stimulation du TCR suffit à induire la prolifération des LT CD8 naïfs ainsi que leur différenciation en cellules effectrices fonctionnelles. Néanmoins, plus la durée du signal TCR est importante, plus les LT CD8 prolifèrent, générant ainsi une population de cellules effectrices plus importante (Prlic et al., 2006). Ainsi, la durée du signal TCR semble davantage influencer sur la capacité de prolifération des LT CD8 plutôt que sur leur différenciation en cellules effectrices fonctionnelles.

La force du signal TCR reçu par les LT CD8 naïfs dépend à la fois de la quantité de complexes CMH-I / antigène disponibles à la surface des DC et de l'affinité du TCR pour ces complexes. L'influence de la quantité de complexes CMH-I / antigène sur l'établissement de réponse T CD8 a notamment été étudié par Vijh et collègues en utilisant plusieurs souches de *Listeria monocytogenes* (Lm) arborant des mutations au niveau de l'antigène p60 qui affecte son association avec le CMH-I et sa présentation par les DC. Ainsi, ils démontrent qu'en infectant des souris avec la même dose de bactérie, l'amplitude de la réponse T CD8 spécifique de l'antigène p60 corrèle directement avec la quantité de complexes CMH-I / p60 présent à la surface des APC (Vijh, 1998). En utilisant un modèle particulier de VV recombinant pour l'antigène OVA, leur permettant de faire varier la quantité de cet antigène à la surface des APC *in vivo*, Wherry et collègues parvinrent à la même conclusion (Wherry et al., 1999). L'influence de l'affinité du TCR sur l'établissement de réponse T CD8 a été étudié de manière très pertinente par Zehn et collègues en 2009. En utilisant différentes souches de Lm portant différents APL (Altered Peptide Ligands) de l'antigène OVA, ils démontrent que l'amplitude de la réponse des LT CD8 TCR transgéniques OTI spécifiques de cet antigène dépend directement de l'affinité du TCR pour son ligand. Une interaction de faible affinité entre le TCR et son ligand permet la production d'un faible nombre de LT CD8 effecteurs et mémoires fonctionnels (Zehn et al., 2009).

Malgré son importance capitale dans l'élaboration de réponses T CD8, le signal TCR ne permet pas la levée des tous les points de contrôle nécessaires à l'activation des LT CD8 naïfs. En effet, un LT CD8 naïf stimulé uniquement via son TCR deviendra anergique c'est à dire à incapable de répondre à ce signal antigénique lors d'une restimulation (Schwartz, 2003). Pour prévenir l'induction de cet état anergique et induire l'activation complète des LT



Récepteurs	Activation	Prolifération	Fonction effectrices	Survie	Mémoire
Superfamille des immunoglobulines	+	+	ND	+	+
	ND	ND	ND	+	+
	ND	-	-	-	-
	ND	-	-	-	-
	-	-	-	-	+/-
	+	+	ND	+	+
Superfamille des récepteurs au TNF	ND	+	+	+	+
	ND	+	+	+	+
	ND	+	+	+	+
	+	+	+	ND	+
	ND	+	ND	+	+
	ND	+	+	ND	ND
	ND	+	ND	ND	ND

**Tableau 3 : Principales molécules de costimulation.**

Tableau présentant une liste non exhaustive des principales molécules de costimulation impliquées dans la biologie des LT CD8. L'impact de chaque molécule sur différentes étapes de l'activation et de la différenciation des LT CD8 est indiqué.

+ : impact positif, - : impact négatif, ND : pas d'impact ou impact non déterminé à ce jour.

CD8 naïfs, le signal TCR doit être couplé à des signaux de costimulation ainsi qu'à des signaux cytokiniques.

- Le signal de costimulation

Le signal de costimulation régule l'activation, la différenciation et la survie des LT CD8. Ce signal de costimulation peut être délivré aux LT CD8 par deux types de récepteurs, des récepteurs activateurs et des récepteurs inhibiteurs. Il existe un très grand nombre de molécules costimulatrices qui, sur base de leur homologie de structure et/ou de séquence, sont classées en deux superfamilles (**Tableau 3**). Ainsi, c'est l'intégration des différents signaux de costimulation (activateurs et inhibiteurs) reçus par le LT CD8 qui déterminera le devenir de cette cellule (Chen and Flies, 2013). Les ligands des récepteurs de costimulation sont exprimés par les APC, soit constitutivement, soit après maturation via la reconnaissance de PAMPs (Pathogen Associated Molecular Patterns) par une famille de récepteurs nommés PRRs (Pattern recognition receptors) exprimés par la plupart des cellules du système immunitaire.

### La superfamille des immunoglobulines

Les récepteurs les mieux caractérisés au sein de cette famille sont le récepteur activateur CD28 et les récepteurs inhibiteurs CTLA4 (Cytotoxic T Lymphocyte Antigen 4) et PD1 (Rudd et al., 2009). Les deux ligands identifiés de CD28 sont les molécules B7.1 (CD80) et B7.2 (CD86), exprimés par les APC à la suite de leur maturation. CD28 est lui constitutivement exprimé par les LT CD8 naïfs (Rudd et al., 2009). En 1989, Lindsten et collègues démontrent que l'engagement de CD28 conjointement à une stimulation du TCR de LT humains a pour effet d'augmenter la stabilité des ARNm codant pour certaines cytokines, notamment le TNF- $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor), l'IFN- $\gamma$  (Interferon), l'IL-2 et le GM-CSF (Granulocytes and Macrophages Colony Stimulating Factor). De manière intéressante, cet effet semble limité aux ARNm codant pour des cytokines, puisque la demi-vie des ARNm codant pour c-myc, c-fos et le récepteur à l'IL-2 n'est pas modifiée par cette costimulation (Lindstein et al., 1989). Depuis, le signal de costimulation délivré via CD28 a été démontré comme étant essentiel à l'établissement de réponses T CD8 efficaces contre différentes infections virales, notamment contre les virus influenza, VSV, VV, mCMV et herpes virus

(Bertram et al., 2002; McAdam et al., 2000; Fuse et al., 2006). Le rôle crucial de l'engagement du récepteur CD28 par ses ligands lors des réponses immunitaires T CD8 s'explique notamment par la grande diversité de molécules intracellulaires sur lesquelles ce signal de costimulation a un impact. En effet, il a été démontré que le signal CD28 permet d'amplifier de manière significative l'activation des facteurs de transcription NFAT, AP-1 et NK- $\kappa$ B, essentiels pour l'activation des LT (Michel et al., 2000; Harhaj et al., 1996; Rincón and Flavell, 1994). Ainsi, le signal costimulateur CD28 permet d'augmenter la transcription de certains gènes, notamment le gène codant pour l'IL-2, cytokine essentielle à la prolifération des LT lors de leur activation (Rincón and Flavell, 1994). Par ailleurs, le signal de costimulation délivré via CD28 permet également d'empêcher la mort des LT par apoptose en induisant l'expression de certaines protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl2, notamment Bcl-X(L) (Okkenhaug et al., 2001; Burr et al., 2001).

L'engagement de CTLA4 a un effet inverse à celui de CD28, à savoir d'inhiber l'activation des LT (Rudd et al., 2009). En effet, il a été démontré que l'engagement de ce récepteur permet d'inhiber l'activation des facteurs de transcriptions NFAT, NF- $\kappa$ B et AP-1 (Fraser et al., 1999). CD28 et CTLA4 partagent les mêmes ligands, néanmoins CTLA4 possède une affinité plus grande que CD28 pour ces ligands, notamment pour CD80. Contrairement à CD28, l'expression de CTLA4 par les LT CD8 est induite après l'engagement de leur TCR par un complexe CMH-I/antigène et devient maximale plusieurs jours après activation (Krummel and Allison, 1995). A cet instant, les deux récepteurs se trouvent alors en compétition pour leurs ligands communs. De plus, lors de son engagement par CD80/86, le récepteur CD28 est endocyté libérant ainsi des ligands pour CTLA4 (Badour et al., 2007). Yokoshuka et collègues montrent que tout comme CD28, CTLA4 est recruté au niveau du cSMAC de la synapse immunitaire lors de son expression par les LT activés. La compétition entre CTLA4 et CD28 pour leurs ligands communs induit une relocalisation de CD28 à la périphérie du cSMAC tandis que CTLA4 est maintenue au centre de cette structure (Yokosuka et al., 2010). Ainsi, l'engagement précoce de CD28 conduit à l'augmentation de l'activation des LT CD8, induisant notamment l'expression de CTLA4 qui permet alors de diminuer le signal reçu par les LT CD8 (Chen and Flies, 2013).

PD1 est un récepteur de costimulation inhibiteur possédant deux ligands (PDL1 et PDL2). Ce récepteur est exprimé par les LT CD8 après engagement de leur TCR. Le signal PD1 permet de réguler les réponses T effectrices, notamment en inhibant le signal TCR (Keir et al., 2008). Iwai et collègues démontrent que des souris déficientes pour PD1 contrôlent beaucoup plus rapidement une infection par un adénovirus que des souris WT. Néanmoins, cette réponse T exacerbée est accompagnée de dommages tissulaires beaucoup plus marqués

au niveau du foie de ces animaux (Iwai et al., 2003). De même, la réponse T CD8 contre le virus LCMV clone 13 dans un environnement déficient pour PDL1 conduit au développement d'immuno pathologies sévères dont succombent les animaux (Barber et al., 2005). Ainsi, le signal PD1 semble important pour contrôler la réponse T CD8, en permettant l'élimination du pathogène tout en limitant le développement d'immuno pathologies fatales à l'organisme.

Lors d'infection aiguës, l'expression de PD1 diminue rapidement après la phase effectrice de la réponse T CD8. A l'inverse, lors d'infections chroniques, l'expression de PD1 est maintenue sur les LT CD8, conduisant à l'inhibition durable de leur fonction (Barber et al., 2005). Cet état, connu sous le terme « d'exhaustion », rends les LT CD8 hypo-répondeurs (faible prolifération, faible production de cytokines et de molécules cytotoxiques) et corrèle avec le développement de l'infection virale chronique à la fois chez la souris (LCMV clone 13) et chez l'homme (HIV) (Barber et al., 2005; Day et al., 2006; Trautmann et al., 2006). Le blocage du signal PD1 via l'injection d'anticorps bloquants anti-PDL1 permet de restaurer les fonctionnalités des LT CD8 et permet l'élimination du virus LCMV clone 13 chez la souris (Barber et al., 2005). De manière similaire, le traitement *in vitro* de LT CD8 humains spécifiques du virus HIV par un anticorps bloquant anti-PDL1 permet de restaurer la fonctionnalité de ces cellules (Day et al., 2006; Trautmann et al., 2006). Le signal PD1 joue également un rôle important dans le développement tumoral. En effet, de nombreuses cellules cancéreuses expriment les ligands de PD1 et de nombreuses études démontrent que cette expression permet aux cellules tumorales d'échapper à l'immuno surveillance en inhibant les fonctions des LT CD8. L'utilisation d'anticorps anti-PD1 et anti-PDL1 en clinique pour bloquer ce signal PD1 démontre des résultats prometteurs dans le traitement de certains types de cancers (mélanome) (Nguyen and Ohashi, 2015).

### La superfamille des récepteurs au TNF

Les membres les mieux décrits au sein de cette famille sont CD27, 4-1BB (CD137) et OX40 (CD134), qui sont tous des récepteurs de costimulation activateurs, interagissant respectivement avec les ligands CD70, 4-1BB ligand (CD137L) et OX40 ligand (CD252). CD27 est constitutivement exprimé par les LT CD8 naïfs et son ligand CD70 est exprimé par les APC matures (Croft, 2009). Certaines études rapportent que l'engagement de CD27 produit un signal de costimulation important pour booster l'efficacité de réponses T CD8 contre des infections aiguës par certains pathogènes, notamment les virus VSV et VV ainsi que la bactérie Lm (Schildknecht et al., 2007). Cependant, lors d'infections par le virus

Influenza, ce signal de costimulation semble davantage influencer sur les réponses T CD8 secondaires (Hendriks et al., 2000).

Tout comme le signal OX40, le signal de costimulation CD27 délivré au moment de la réponse immunitaire primaire conditionne les LT CD8, leur permettant d'acquérir des propriétés fonctionnelles de LT CD8 mémoires. En effet, les LT CD8 mémoires générés en absence de signal de costimulation CD27 présentent d'important défaut de prolifération et de production d'IFN- $\gamma$  lors d'une seconde infection par le même pathogène (Dolfi et al., 2008; Dong et al., 2012). Le rôle du signal de costimulation délivré par CD27 dans des contextes d'infections virales chronique est plus controversé. En effet, des études rapportent que des patients atteints d'un déficit génétique de CD27 succombent à des infections chroniques par le virus d'Epstein-Barr (EBV), suggérant un rôle important de ce signal de costimulation dans le contrôle de l'infection chronique (van Montfrans et al., 2012; Salzer et al., 2013). A l'inverse, les études de Matter et collègues et Penaloza-MacMaster et collègues démontrent que lors d'une infection chronique par le virus LCMV, le blocage du signal de costimulation CD27 permet, entre autre, d'augmenter la réponse T CD8 et d'éliminer le virus (Matter et al., 2006; Penaloza-MacMaster et al., 2011).

Contrairement à CD27, l'expression de 4-1BB par les LT CD8 est induite après engagement du TCR. L'utilisation de souris déficientes pour le ligand de 4-1BB a permis de mettre en évidence l'importance de ce signal dans l'amplification des réponses T CD8 primaires. En effet, lors d'infections virales par le virus LCMV ou Influenza, l'absence de signal de costimulation 4-1BB conduit à la génération d'un nombre plus faible de LT CD8 effecteurs spécifiques du pathogène (Tan et al., 1999; Hendriks et al., 2005). A l'inverse, l'injection d'un anticorps agoniste de 4-1BB durant une infection par le virus Influenza augmente le nombre de LT CD8 spécifiques d'antigène sous-dominants associés à ce virus (Halstead et al., 2002). Bien que moins nombreux, les LT CD8 effecteurs générés en absence de signal 4-1BB sont parfaitement fonctionnels, conduisant à l'élimination efficace du pathogène (Tan et al., 1999; Hendriks et al., 2005). Le signal 4-1BB est également important pour la génération de LT CD8 mémoires fonctionnels. En transférant dans des souris WT des LT CD8 mémoires générés dans un environnement déficient pour 4-1BB-L, Hendricks et collègues démontrent que ces cellules présentent un déficit de prolifération lors d'une seconde infection avec le pathogène dont elles sont spécifiques. Ainsi, le signal de costimulation 4-1BB semble également important pour « éduquer » les futurs LT CD8 mémoires générés à proliférer de manière importante lors d'un second contact avec l'antigène dont ils sont spécifiques (Hendriks et al., 2005).

Le signal de costimulation est donc un signal complexe puisqu'il existe une très grande variété de paires récepteur/ligand capables de délivrer des signaux de costimulations activateurs ou inhibiteurs aux LT CD8. Le timing d'expression de ces différentes paires ainsi que leur combinaison régulent la nature du signal de costimulation délivré. Les LT CD8 devront donc intégrer les différents signaux de costimulation émanant des différents récepteurs et c'est la somme de ces signaux qui permettra d'induire des modifications substantielles au niveau de la cellule. Néanmoins, en plus des signaux 1 et 2, l'induction d'un programme de différenciation complet en cellules T CD8 effectrices fonctionnelles nécessite l'intégration d'un troisième signal par les LT CD8 au moment de leur activation.

- Le signal cytokinique.

La réception d'un signal cytokinique constitue le troisième point de contrôle dans le processus d'activation des LT CD8. Plusieurs cytokines pro-inflammatoires permettent de délivrer ce signal 3 aux LT CD8 (Curtsinger and Mescher, 2010).

Dès 1999, des études *in vitro* mettent en évidence que l'ajout d'IL-12 ou d'IFN-I lors de l'activation de LT CD8 naïfs par les signaux 1 et 2 augmente considérablement l'amplitude des réponses T CD8 notamment en augmentant la capacité de prolifération de ces cellules (Curtsinger et al., 1999; Schmidt and Mescher, 1999; Curtsinger et al., 2005; Le Bon et al., 2006). L'utilisation de modèles de LT CD8 transgéniques pour le TCR et déficients pour les récepteurs de ces cytokines a permis de mettre en évidence que l'amplitude des réponses T CD8 dépend directement du signal induit par ces cytokines dans les LT. Cependant, la dépendance à l'une ou l'autre de ces cytokines est liée en grande partie au type de pathogène utilisé (Way et al., 2007; Aichele et al., 2006; Kolumam et al., 2005; Keppler et al., 2009).

L'étude de Starbeck-Miller et collègues a permis d'identifier certains mécanismes moléculaires impliqués dans l'augmentation de la réponse T CD8 via le signal 3. Ils démontrent, dans un modèle d'immunisation par injection de DC chargées avec l'antigène OVA, que l'injection de CpG (permettant d'induire la production de nombreuses cytokines pro-inflammatoires dont l'IL-12) augmente et maintient la transcription de gènes associés au cycle cellulaire dans les LT CD8 OTI, favorisant la prolifération de ces cellules. Cet effet est lié au maintien de l'expression de la chaîne  $\alpha$  du récepteur à l'IL-2 (CD25) induit par le signal IL-12 et IFN-I, permettant ainsi aux LT CD8 d'être sensibles plus longtemps à cette cytokine connue pour être un important facteur de prolifération des LT CD8 (Starbeck-Miller et al., 2014). Les signaux IL-12 et IFN-I permettent également d'augmenter l'efficacité des réponses

T CD8. Des expériences de microarrays démontrent que lors de l'activation des LT CD8 naïfs durant 72h en présence des signaux 1 et 2, l'ajout d'IL-12 ou d'IFN- $\alpha\beta$  permet d'augmenter la transcription de respectivement 730 et 610 gènes comparé à une activation en présence des signaux 1 et 2 uniquement. Cette transcription augmentée des gènes s'explique par l'action de l'IL-12 et de l'IFN-I sur la chromatine. En effet, le signal induit par ces deux cytokines permet d'augmenter l'acétylation des histones au niveau du promoteur des gènes cibles (*granzyme B* et *eomes* dans le cadre de cette étude), modifiant ainsi la structure de la chromatine et augmentant l'accessibilité de ce promoteur pour les ARN polymérases (Agarwal et al., 2009). Un second mécanisme permettant au signal 3 d'augmenter l'efficacité des réponses T CD8 effectrices a été mis en évidence. Richer et collègues démontrent en effet que le signal 3 permet d'augmenter de manière significative la sensibilité du TCR des LT CD8 effecteurs. Cette sensibilité accrue s'explique par l'augmentation des signaux de signalisation proximaux en aval du TCR, notamment la phosphorylation de ZAP70, PLC- $\gamma$  et ERK (Richer et al., 2013). En plus des effets à court terme, le signal 3 a un impact sur la génération de LT CD8 mémoires fonctionnels (Xiao et al., 2009).

L'IL-21 est une cytokine pro-inflammatoire produite par les LT CD4 et délivrant également un co-signal aux LT CD8. Dans un contexte d'infection chronique par le virus LCMV clone 13, des souris déficiente pour l'IL-21, le récepteur à l'IL-21 ou pour les LT CD4 présentent un phénotype hypo-répondeur des LT CD8 spécifiques du pathogène ainsi qu'une persistance de l'infection. L'injection d'IL-21 dans les souris déficientes en LT CD4 infectées avec LCMV clone 13 suffit à restaurer une réponse T CD8 efficace et conduit à l'élimination du pathogène (Elsaesser et al., 2009; Fröhlich et al., 2009).

En conclusion, le signal cytokinique permet de lever le dernier point de contrôle régulant l'activation des LT CD8 naïfs. Ce signal a un impact direct sur l'amplitude de la réponse T CD8 mais également sur sa qualité et sur la génération de LT CD8 mémoires fonctionnels.

### c) Le help CD4

Plusieurs études démontrent qu'un signal de help, délivré par les LT CD4, est nécessaire pour établir une réponse immunitaire T CD8 efficace. Si la réception de ce signal de help ne semble généralement pas avoir d'impact sur la réponse immunitaire primaire, il semble essentiel pour induire la génération et le maintien de LT CD8 mémoires fonctionnels. En effet, des LT CD8 mémoires conventionnels générés en absence de LT CD4 sont peu



réactifs lors d'une seconde rencontre avec l'antigène dont ils sont spécifiques. Plusieurs études s'accordent à dire que c'est la réception du signal help CD4 durant la réponse primaire qui conditionne la réactivité des LT CD8 mémoires générés. Ainsi, le transfert de LT CD8 mémoires, générés dans des souris WT, dans des souris présentant un déficit de LT CD4 (CD4<sup>-/-</sup> ou CMH-II<sup>-/-</sup>) et infectées avec le même pathogène conduit à une réponse secondaire fonctionnelle de ces cellules mémoires. A l'inverse, des LT CD8 mémoires générés dans des hôtes CD4<sup>-/-</sup> ou CMH-II<sup>-/-</sup> produisent une réponse secondaire très faible, même lorsqu'ils sont transférés dans un hôte WT (Janssen et al., 2003; Fuse et al., 2009).

L'implication du help CD4 dans les réponses T CD8 reste néanmoins très controversée. Shedlock et collègues démontrent que lors d'infection par Lm, la réponse T CD8 est faiblement dépendante du help CD4 (Shedlock et al., 2003). L'étude de Sun et collègues contredit celle de Shedlock et collègues, démontrant que l'absence de help CD4 lors d'une infection par la bactérie Lm conduit à un maintien plus faible des LT CD8 mémoires ainsi qu'à une réactivité plus faible de ces cellules (Sun and Bevan, 2003). De même, si Fang et collègues démontrent que les LT CD8 mémoires générés en absence de LT CD4 lors d'infection par VV sont parfaitement fonctionnels, Fuse et collègues démontrent exactement l'inverse (Fang et al., 2015; Fuse et al., 2009). Bien que ces études utilisent la même souche de pathogène, la dose utilisée pour immuniser les souris varie très fortement (de 25000 à 500000 fois). Ainsi, il semble que des modèles d'infection utilisant peu d'agent pathogène favorise l'établissement de réponse T CD8 dépendantes du help CD4. A l'inverse, l'immunisation par de grandes quantités de pathogène contribue à l'établissement de réponses T CD8 indépendantes du help CD4, probablement à cause de l'important niveau d'inflammation induit par un tel protocole d'immunisation.

Dans le cadre de réponses T CD8, le mode d'action le plus couramment décrit du help CD4 implique un conditionnement des DC par les LT CD4 via l'engagement du récepteur CD40 par son ligand CD40L. Ce conditionnement a pour effet d'augmenter l'expression de molécules de costimulation, permettant alors aux DC d'activer efficacement les LT CD8 naïfs (Schoenberger, 1998; Bennett et al., 1998; Ridge et al., 1998). Les cytokines produites par les LT CD4, notamment l'IL-2 et l'IL-21 peuvent également délivrer ce signal de help aux LT CD8 (Wilson and Livingstone, 2008; Elsaesser et al., 2009; Fröhlich et al., 2009). Castellino et collègues ont identifié un autre mécanisme du help CD4. Ils co-transfèrent dans des souris des LT CD8 OTI et des LT CD4 OTII (transgéniques pour le TCR, spécifiques de l'antigène OVA<sub>323-339</sub> présenté en association avec le CMH-II). Ces souris sont ensuite injectées en sous-cutané à deux endroits distincts (flancs droit et gauche) avec des DC chargées avec différents antigènes. Le flanc droit est injecté avec des DC chargées avec les antigènes OTI et OTII



tandis que le flanc gauche est injecté avec des DC chargées uniquement avec l'antigène OTI. Ils observent que les LT CD8 OTI se localisent préférentiellement dans le ganglion drainant le flanc droit, lieu d'interaction des DC avec les LT CD4. Ils démontrent que cette localisation préférentielle est due à une attraction des LT CD8 vers les complexes DC/LT CD4 par les chimiokines CCL3 et CCL4 produites par ces cellules (Castellino et al., 2006; Castellino and Germain, 2007). Deux études récentes proposent cependant une vision différente du help CD4. En utilisant la microscopie intravitale, Hor et Eickhoff démontrent en effet que les LT CD4 et les LT CD8 sont en réalité activés par différentes sous-populations de DC. Les LT CD4 sont activés en premier par une population de DC non infectée par le pathogène, tandis que l'activation des LT CD8 intervient plus tard et requière une interaction avec les DC CD8 $\alpha$ + XCR1+ résidentes du ganglion. L'activation préalable des LT CD4 leur permet d'induire un signal de help au niveau des DC CD8 $\alpha$ + XCR1+, permettant ainsi à ces cellules d'activer pleinement les LT CD8 (Hor et al., 2015; Eickhoff et al., 2015).

L'intégration des trois signaux que nous venons de détailler permet aux LT CD8 naïfs d'être pleinement activés et d'acquérir l'expression d'un programme de différenciation en cellules effectrices. A l'issue de leur interaction avec les APC, les LT CD8 activés prolifèrent massivement et se différencient donc en cellules effectrices, armées pour éliminer les cellules infectées par le pathogène.

## 2. Prolifération clonale et switch métabolique

L'activation des LT CD8 conduit à une importante phase de prolifération clonale au niveau des OLS. Certaines études rapportent que chaque LT CD8 naïf activé est capable d'effectuer entre 14 et 19 cycles de division. Grace à cette incroyable capacité de prolifération, le nombre de LT CD8 spécifiques d'un antigène donné augmente de  $10^4$  à  $10^5$  fois et est maximal environ 7 à 8 jours après infection (Badovinac et al., 2007; Blattman et al., 2002). Cette étape, extrêmement coûteuse en énergie, est précédée de modifications métaboliques importantes au sein des LT CD8 activés, notamment l'utilisation de la glycolyse aérobie comme source d'énergie principale. Ainsi, ces cellules passent d'un métabolisme catabolique à un métabolisme anabolique, permettant de produire les composants essentiels à la génération de nouvelles cellules (Pollizzi and Powell, 2014; Michalek and Rathmell, 2010). Il est important de noter que ce switch métabolique n'est que transitoire. En effet, lors de la différenciation en LT CD8 mémoires, un métabolisme catabolique est à nouveau adopté.

### 3. La différenciation en cellules effectrices

La population de LT CD8 effecteurs est hétérogène. Ainsi, comme pour les LT CD4, on distingue différentes sous-populations de LT CD8 (Tc1, Tc2, Tc9, Tc17, Treg) classées selon les cytokines qu'elles sécrètent ainsi que selon les réponses effectrices qu'elles produisent (Mittrücker et al., 2014). Dans la suite de cette introduction, nous nous concentrerons uniquement sur la population de LT CD8 Tc1 qui est la plus représentée et la mieux caractérisée. Parmi les fonctions effectrices les plus remarquables des LT CD8, nous pouvons citer leur capacité à produire différentes molécules cytotoxiques leur permettant d'éliminer les cellules infectées ainsi que leur capacité à produire différentes cytokines essentielles pour le contrôle de l'infection.

#### a) Les fonctions cytotoxiques

L'acquisition de fonctions cytotoxiques lors de la différenciation en cellules effectrices est une propriété essentielle garantissant le succès de la réponse immunitaire T CD8. C'est en effet grâce à ces fonctions cytotoxiques que les LT CD8 effecteurs vont pouvoir éliminer spécifiquement les cellules infectées par le pathogène. Trois grands systèmes sont impliqués dans la cytotoxicité médiée par les LT CD8 : le système perforine/granzyme, le système Fas/Fas ligand et le système Trail/DR5.

- Le système granzyme/perforine

Les LT CD8 effecteurs possèdent au sein de leur cytoplasme des granules de sécrétion, appelés granules cytotoxiques, contenant de grandes quantités de molécules cytotoxiques (perforine et granzyme). La reconnaissance via le TCR de complexes CMH-I/antigène du pathogène à la surface d'une cellule infectée induit une série de modifications morphologiques du LT CD8 effecteur, récemment documentée par Ritter et collègues (Ritter et al., 2015). Ainsi, dans la minute suivant le contact avec la cellule cible, le cytosquelette d'actine subit une importante réorganisation au niveau de la zone de contact entre les deux cellules, laissant apparaître une zone centrale pauvre en actine. Simultanément, les granules cytotoxiques, associés au réseau de microtubules, se relocalisent au niveau du MTOC (Micro tubule Organizing Center) qui migre alors depuis l'uropode vers la zone centrale de la

synapse cytotoxique pauvre en actine. Après fusion des granules cytotoxiques avec la membrane plasmique, le contenu de ces granules est libéré, conduisant à la mort de la cellule cible (Ritter et al., 2015; de Saint Basile et al., 2010).

La perforine, petite protéine monomérique, s'oligomériser en conditions de pH neutre et en présence de calcium au niveau de la membrane plasmique de la cellule cible pour former des pores permettant le passage des granzymes. Deux modèles s'affrontent quand à la manière dont les granzymes pénètrent dans la cellule cible. Un premier modèle, initié par Froelich et collègues en 1996, suggère que les granzymes et pores de perforine sont internalisés par la cellule cible au niveau d'endosomes dépendant de clathrines et dynamine appelés également gigantosomes. Au niveau de ces endosomes, les pores de perforines s'associeraient pour former une structure de plus gros diamètre, permettant la libération des granzymes dans le cytoplasme (Froelich et al., 1996; Thiery et al., 2011; Keefe et al., 2005). Un second modèle suggère que les granzymes diffuseraient à travers les pores formés par les oligomères de perforine. L'observation au microscope électronique des pores de perforine met en évidence une taille luminale variant de 5 à 30nm, ce qui permettrait théoriquement aux granzymes d'environ 4 à 5nm de passer par ce lumen (Law et al., 2010). Néanmoins ce modèle fut contesté par le fait que des pores de perforines ne permettent pas l'entrée dans la cellule de colorant tel que l'iodure de propidium (PI). En 2013, Lopez et collègues démontrent néanmoins que l'entrée de PI dans la cellule via les pores de perforine est possible lorsque la concentration de ce colorant dans le milieu extracellulaire est importante. De plus, ils démontrent qu'en présence de pores de perforine, l'inhibition de l'endocytose n'altère pas la cytotoxicité médiée par les granzymes (Lopez et al., 2013). Les granzymes sont une famille de sérine protéases constituée de 10 membres chez la souris, parmi lesquels les granzymes A et B sont les mieux caractérisés (Voskoboinik et al., 2015). Néanmoins, différents granzymes semblent impliqués dans l'activité cytotoxique des LT CD8, comme le démontre l'élimination de différentes tumeurs par des LT CD8 double déficients pour les granzymes A et B via un mécanisme dépendant de la perforine (Smyth et al., 2003). Une fois dans le cytoplasme de la cellule cible, les granzymes vont induire l'apoptose de cette cellule. Plusieurs voies de déclenchement de l'apoptose par les granzymes ont été mises en évidence chez l'homme et la souris. Néanmoins, la plus connue demeure l'activation de la voie des caspases, initiée via le clivage de la caspase 3 par le granzyme B (Darmon, 0AD; Adrain et al., 2005).

- Les systèmes Fas/Fas ligand et DR5/Trail

En plus du système perforine/granzyme, les LT CD8 effecteurs possèdent d'autres armes pour éliminer les cellules infectées. En effets, ils expriment les ligands de certains récepteurs appartenant à la famille des récepteurs au TNF, dont Fas (CD95) et DR5. L'engagement de Fas et DR5 par leur ligand respectifs Fas ligand et Trail conduit à l'induction de l'apoptose via l'activation de la capsase 8 (Strasser et al., 2009; Sträter and Möller, 2004). Plusieurs études rapportent ainsi que les LT CD8 effecteurs exprimant Fas ligand et Trail éliminent les cellules infectées, notamment par le virus influenza, grâce à l'engagement de Fas et DR5 (Kägi et al., 1994; Topham et al., 1997; Li et al., 1998; Brincks et al., 2008).

#### b) La production de cytokines

Les LT CD8 effecteurs produisent de nombreuses cytokines, notamment l'IFN- $\gamma$ , le TNF $\alpha$  et l'IL-2. L'IFN- $\gamma$  est une cytokine essentielle pour le contrôle d'infections par différents types de pathogènes. Par exemple, le contrôle d'infection par la bactérie *Mycobacterium tuberculosis* dépend de la sécrétion d'IFN- $\gamma$  par les LT CD8 (Tascon et al., 1998). Cette cytokine régule à la fois les acteurs de l'immunité innée et adaptative. L'IFN- $\gamma$  active les macrophages, permettant d'augmenter la capacité de phagocytose de ces cellules. L'IFN- $\gamma$  induit également l'augmentation de l'expression des molécules de CMH-I à la surface des cellules, avec pour effet direct l'augmentation des réponses T CD8. De plus, tout comme l'IFN-I, l'IFN- $\gamma$  permet l'établissement d'un état anti-viral, en inhibant la réplication virale (Schroder et al., 2004; Zhou, 2009). Le TNF $\alpha$  est une cytokine essentielle pour la réponse immunitaire, qui permet notamment l'activation des macrophages. Certaines études suggèrent que cette cytokine régule négativement les réponses T CD8. En effet, l'infection par LCMV de souris déficientes pour la production ou la signalisation du TNF conduit à la génération de réponses T CD8 exacerbées, favorisant la génération d'un nombre plus important de LT CD8 mémoires (Singh and Suresh, 2007; Suresh et al., 2005). Enfin, L'IL-2 est une cytokine essentielle à la prolifération des LT CD8. En absence de signal IL-2, l'amplitude de la réponse T CD8 est très fortement diminuée (Boyman and Sprent, 2012).

En plus des cytokines, les LT CD8 effecteurs sécrètent également plusieurs chimiokines, notamment CCL3, CCL4, CCL5 et XCL1 (Dorner et al., 2002). Ces molécules possèdent un fort pouvoir chimiotactique, permettant l'attraction de cellules exprimant les récepteurs de ces chimiokines. Par exemple, l'étude de Hugues et collègues démontre que la production par les LT CD8 activés de chimiokines liant le récepteur CCR5 (CCL3/4/5) permet de diriger les LT CD8 naïfs vers les DC capables de leur présenter l'antigène. Ce

mécanisme permet ainsi d'amplifier significativement la réponse T CD8 contre un antigène (Hugues et al., 2007). Ces chimiokines possèdent également d'autres fonctions indépendantes de leur pouvoir chimiotactique. En effet, il a été démontré que le traitement de LT CD8 avec de fortes concentrations ( $\mu\text{M}$ ) de CCL5 conduit à l'agrégation de cette chimiokine à la surface des ces cellules, conduisant à leur activation indépendamment de la reconnaissance d'un antigène (Bacon et al., 1995; Appay et al., 2000). De même, le traitement de macrophages infectées par Lm avec les chimiokines CCL3/4/5 et XCL1 permet d'augmenter significativement leur production de TNF- $\alpha$  (Dorner et al., 2002). La chimiokine XCL1 est produite très rapidement par les LT CD8 activés et joue un rôle essentiel dans l'établissement de réponses T CD8 efficaces. En effet, des LT CD8 déficients pour la production de XCL1 prolifèrent peu en réponse à une stimulation antigénique et présentent un défaut d'acquisition de fonctions effectrices (production d'IFN- $\gamma$ , cytotoxicité) (Dorner et al., 2009). De même, des souris déficientes pour le récepteur de XCL1 (XCR1) présentent une réponse T CD8 altérée lors d'une infection par la bactérie Lm, indiquant que le signal induit par cette chimiokine est important pour l'établissement de réponses T CD8 efficaces (Crozat et al., 2010). Il est intéressant de noter que seules les DC CD8 $\alpha^+$  résidentes des OLS expriment XCR1 et sont capables de migrer contre un gradient de XCL1 (Dorner et al., 2009). L'ensemble de ces données suggère que la production de XCL1 par les LT CD8 permettrait de renforcer leur interaction avec les DC CD8 $\alpha^+$  leur présentant l'antigène, assurant ainsi une intégration complète des signaux nécessaires à l'activation totale des LT CD8.

#### 4. Différenciation en LT CD8 mémoires conventionnels

##### a) Le modèle SLEC / MPEC

La population de LT CD8 effecteurs a longtemps été considérée comme étant homogène, chacune de ces cellules possédant un potentiel de différenciation en cellule mémoire équivalent. Néanmoins, de nombreuses études ont par la suite révélées que, tout comme la population de LT CD8 mémoires, la population de LT CD8 effecteurs est hétérogène, composée de sous-populations de cellules possédant différentes caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles.

Kaech et collègues furent les premiers à mettre en évidence que la population de LT CD8 effecteurs générée 8 jours après infection est hétérogène (Kaech et al., 2003). A la suite d'une infection par le virus LCMV, ils identifient, basé sur l'expression de la chaîne  $\alpha$  du

récepteur à l'IL-7 (CD127), deux populations de cellules effectrices, respectivement CD127<sup>lo</sup> et CD127<sup>hi</sup>. Le transfert de ces deux populations de LT CD8 effecteurs dans des souris naïves révèle que seuls les LT CD8 effecteurs CD127<sup>hi</sup>, exprimant de plus forts niveaux des protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-X(L), sont capables de se différencier en LT CD8 mémoires fonctionnels. A l'inverse, les LT CD8 effecteurs CD127<sup>lo</sup> sont progressivement éliminés après contraction de la réponse immunitaire (Kaech et al., 2003). L'étude de Joshi et collègues démontre que l'expression de KLRG1 (Killer cell Lectin-like Receptor subfamily G member 1) permet également de distinguer très tôt (4,5 jours après infection par le LCMV) ces deux sous-populations de cellules effectrices (Joshi et al., 2007). Ainsi, la population de LT CD8 effecteurs est composée à la fois de cellules effectrices à faible durée de vie, nommées SLEC (Short Lived Effector Cell, CD127<sup>lo</sup> KLRG1<sup>hi</sup>), et de cellules effectrices à longue durée de vie, nommé MPEC (Memory Precursor Effector Cell, CD127<sup>hi</sup>, KLRG1<sup>lo</sup>). Contrairement aux SLEC, les MPEC survivent davantage lors de la phase de contraction et se différencient alors en LT CD8 mémoires.

Bien que possédant un potentiel de génération de LT CD8 mémoires très différent, les SLEC et les MPEC possèdent un transcriptome très similaire. Sarkar et collègues démontrent en effet que seulement 79 gènes sont différentiellement exprimés entre ces deux populations de cellules. Il est important de noter que même si les MPEC constituent les précurseurs de cellules mémoires, ils possèdent également des fonctions effectrices. En particulier, ces cellules expriment le granzyme B et sont capables d'éliminer des cellules cibles par cytotoxicité *in vitro* aussi efficacement que les SLEC (Sarkar et al., 2008). De plus, *in vivo* en présence d'antigène, les MPEC possèdent un potentiel de dégranulation équivalent à celui des SLEC (Yuzefpolskiy et al., 2015). Le transcriptome des MPEC est par ailleurs très différent de celui de LT CD8 mémoires, avec plus de 5900 gènes différentiellement exprimés entre ces deux populations de cellules (Sarkar et al., 2008). Ces données suggèrent que bien que contenant les précurseurs de LT CD8 mémoires, la population de MPEC est majoritairement composée d'effecteurs participant activement à la réponse immunitaire primaire. Des données récentes obtenues au sein de notre équipe soutiennent cette hypothèse en démontrant clairement l'existence de plusieurs sous-populations au sein des MPEC. Ainsi, la population de MPEC est composée de LT CD8 effecteurs précoces, de LT CD8 effecteurs tardifs et de précurseurs de LT CD8 mémoires (Arpin, 2015, soumis).

## b) Facteurs régulant la différenciation en SLEC et MPEC

Quand et comment la différenciation en SLEC ou en MPEC est-elle régulée ? Cette question soulève de nombreux débats au sein de la communauté scientifique. De nombreux facteurs, environnementaux et intrinsèques aux LT CD8, régulent la décision de différenciation en SLEC ou en MPEC.

- Division asymétrique et hétérogénéité des LT CD8 naïfs

L'hypothèse selon laquelle SLEC et MPEC seraient générés à partir de LT CD8 naïfs différents a rapidement été réfutée. Stemberger et collègues démontrent en effet que le transfert d'un seul LT CD8 OTI naïf dans des souris suivies d'une infection par *Lm* exprimant l'antigène OVA conduit à la génération d'une population de LT CD8 effecteurs hétérogène (composée à la fois de MPEC et de SLEC) et au maintien d'une population de LT CD8 mémoires fonctionnels (Stemberger et al., 2007). Une observation similaire fut réalisée par Gerlach et collègues en utilisant un système de barcoding à ADN afin d'identifier précisément chaque LT CD8 naïf ainsi que sa descendance (Gerlach et al., 2010). En 2007, Chang et collègues démontrent que la première division d'un LT CD8 naïf activé (initiée lors du contact avec la DC présentant l'antigène) est asymétrique. En effet, ils observent une répartition hétérogène de différentes protéines entre les deux cellules filles (proximale et distale) (Chang et al., 2007). Une analyse phénotypique des cellules filles proximales et distales révèle que les cellules proximales présentent une plus forte expression du récepteur de l'INF- $\gamma$ , de la chaîne  $\alpha$  du récepteur à l'IL-2 (CD25) et des molécules effectrices granzyme B et IFN- $\gamma$ . À l'inverse, les cellules filles distales possèdent un plus fort niveau d'ARNm codant pour CD127. Le transfert dans des hôtes séparés de cellules filles LT CD8 P14 proximales et distales suivies d'une infection par la bactérie *Lm* exprimant l'antigène P14 révèle que ces deux populations permettent de contrôler rapidement l'infection. En revanche, seule la population de cellules filles distales permet de contrôler une infection effectuée 30 jours après le transfert, suggérant la génération d'une population de LT CD8 mémoires fonctionnels. Ainsi, cette étude révèle que l'acquisition du potentiel mémoire est probablement liée très tôt, au moment de la première division asymétrique effectuée par un LT CD8 naïf. Néanmoins, plusieurs études démontrent que la proportion de SLEC et de MPEC générés est extrêmement variable d'un LT CD8 naïf à un autre, même si ces cellules possèdent la même spécificité antigénique et la même affinité pour leur antigène (Plumlee et al., 2013; Gerlach et al., 2013; Lemaître et al., 2013). Cet effet semble être intrinsèque à chaque LT CD8 naïf et pourrait s'expliquer par l'hétérogénéité de ces cellules. En effet, Feinerman et collègues démontrent que l'expression des protéines CD8, ERK et SHP-1 est hétérogène au sein de la



population de LT CD8 OTI naïfs. Ces protéines jouent un rôle clé dans la régulation de la transduction du signal activateur délivré par reconnaissance de complexes CMH-I/antigène. Par exemple, plus un LT CD8 naïf OTI exprime un niveau de CD8 élevé, plus la quantité d'antigène nécessaire pour activer cette cellule est faible (Feinerman et al., 2008). Ainsi, il semble que l'expression hétérogène au sein de la population de LT CD8 naïfs de protéines impliquées dans la régulation de la transduction du signal activateur va influencer sur la voie de différenciation adoptée.

- Le signal de costimulation

Comme nous l'avons vu précédemment, le signal de costimulation, notamment via CD28, est essentiel pour l'activation des LT CD8 naïfs. Néanmoins, une certaine hiérarchie existe au sein des différents signaux de costimulation. Ainsi, bien qu'ayant peu d'influence sur la génération d'une réponse T CD8 primaire, certains signaux de costimulation délivrés via les récepteurs au TNF influent sur la génération de LT CD8 mémoires. Par exemple, l'élimination du signal OX40 durant la réponse immunitaire primaire T CD8 contre différents pathogènes conduit à la diminution du nombre de MPEC au sein de la population de cellules effectrices et à la génération d'un nombre beaucoup plus faible de LT CD8 mémoires (Mousavi et al., 2008; Hendriks et al., 2005). A l'inverse, l'utilisation d'un anticorps agoniste d'OX40 durant la réponse immunitaire primaire permet de booster la génération de LT CD8 mémoires lors d'infection par des souches peu virulentes de VV ou lors de vaccinations par un adénovirus recombinant (Salek-Ardakani et al., 2011; Bassett et al., 2012). Le signal de costimulation délivré par le récepteur CD27 favorise également la génération de LT CD8 mémoires. Dong et collègues démontrent que le signal de costimulation CD27 délivré durant la réponse immunitaire primaire augmente l'expression de CD127 à la surface des LT CD8 tout en restreignant l'expression des récepteurs de cytokines pro-inflammatoires IL-2 et IL-12. Il en résulte une proportion de MPEC plus importante au pic de la réponse immunitaire et la génération d'un plus grand nombre de LT CD8 mémoires (Dong et al., 2012).

- L'environnement inflammatoire

L'infection par un pathogène induit une inflammation importante dans l'organisme. Le niveau d'inflammation ainsi que la composition de l'environnement inflammatoire influent



grandement sur la différenciation des LT CD8 en SLEC ou en MPEC. L'étude de Badovinac et collègues démontre particulièrement bien l'influence du niveau d'inflammation sur la génération de SLEC et de MPEC (Badovinac and Harty, 2007). En traitant des souris avec de l'ampicilline 2 jours avant une infection par une souche atténuée de Lm, ils démontrent que la diminution du niveau d'inflammation a pour effet de générer environ 15 fois moins de LT CD8 effecteurs spécifiques de l'antigène LLO<sub>91-99</sub> au pic de la réponse immunitaire primaire. Néanmoins, l'abrogation de l'inflammation n'a aucun effet sur la quantité de LT CD8 mémoires spécifiques de LLO<sub>91-99</sub> générés ni sur les fonctions de ces cellules mémoires (Badovinac and Harty, 2007).

La cytokine pro inflammatoire IL-12 influence grandement la différenciation des LT CD8 en SLEC. En effet, Cui et collègues démontrent que lors d'immunisations par injection de DC pulsées avec un antigène, la génération de SLEC dépend de la signalisation de l'IL-12 dans les LT CD8 tandis que la génération de MPEC est indépendante de ce signal (Cui et al., 2009). De même, Joshi et collègues démontrent que le niveau d'inflammation, et plus particulièrement le niveau d'IL-12, influe directement sur le niveau d'expression du facteur de transcription Tbet dans les LT CD8. Ce facteur de transcription est un régulateur majeur de la différenciation en SLEC. En effet, le niveau d'expression de T-bet est plus élevé dans les SLEC que dans les MPEC et une forte activité de ce facteur de transcription lors de la réponse immunitaire primaire contre LCMV suffit à induire la différenciation des LT CD8 en SLEC (Joshi et al., 2007).

L'IFN- $\alpha$  est également une cytokine pro-inflammatoire qui favorise la différenciation en SLEC. En effet, lors d'infections virales dans un contexte inflammatoire de type IFN- $\alpha$ , des LT CD8 déficients pour le récepteur à l'IFN- $\alpha$  se différencient préférentiellement en MPEC. Les LT CD8 mémoires résultant de la différenciation de ces MPEC sont par ailleurs pleinement fonctionnels. Tout comme l'IL-12, le signal IFN- $\alpha$  dans les LT CD8 durant leur activation induit l'expression de Tbet (WIESEL and OXENIUS, 2012).

L'intensité du signal IL-2 lors de la réponse immunitaire primaire est également un facteur déterminant dans la différenciation en SLEC ou en MPEC. Lors d'immunisation de souris par des DC chargées avec l'antigène OVA, la diminution du signal IL-2 via l'injection d'anticorps neutralisant diminue la génération de SLEC. A l'inverse, l'injection simultanée de DC-OVA et d'IL-2 augmente considérablement la génération de SLEC, via l'expression du facteur de transcription Blimp-1 (Boulet et al., 2014). Une étude de Kalia et collègue met en évidence une hétérogénéité d'expression de la chaîne  $\alpha$  du récepteur à l'IL-2 (CD25) au sein de la population de LT CD8 effecteurs très précocement après infection par le virus LCMV. Contrairement aux LT CD8 effecteurs CD25<sup>lo</sup>, les LT CD8 effecteurs CD25<sup>hi</sup> reçoivent un

signal IL-2 plus intense, conduisant à l'expression de plus forts niveaux des facteurs de transcriptions Tbet et Blimp-1. A l'issue de la phase de contraction, ces LT CD8 effecteurs CD25<sup>hi</sup> sont très largement éliminés et génèrent peu de LT CD8 mémoires contrairement aux LT CD8 effecteurs CD25<sup>lo</sup> (Kalia et al., 2010). Ainsi, un signal IL-2 intense favorise la différenciation en SLEC tandis qu'un signal IL-2 faible favorisera la différenciation en MPEC.

Enfin, le signal délivré par l'IFN- $\gamma$  favorise également la génération de SLEC. Badovinac et collègues démontrent en effet dans un modèle d'immunisation par DC chargées avec un antigène que l'injection de CpG pour augmenter le niveau d'inflammation conduit à la diminution du nombre de LT CD8 mémoires générés dans des souris WT mais pas dans des souris déficientes pour le récepteur à l'IFN- $\gamma$  (Badovinac et al., 2005).

L'ensemble de ces données indique que la quantité de signal inflammatoire reçue par un LT CD8 régule au moins en partie sa différenciation en SLEC ou en MPEC. Les LT CD8 recevant de forts signaux inflammatoires se différencieront préférentiellement en SLEC tandis que les cellules recevant de plus faibles signaux inflammatoires se différencieront en MPEC.

- La localisation anatomique

La différenciation des LT CD8 en SLEC ou en MPEC est également régulée de manière indirecte, par l'accès des LT CD8 aux différents signaux environnementaux. En utilisant un système de transfert de cellule unique suivi d'une infection orale par Lm exprimant l'antigène OVA, Plumlee et collègues démontrent que l'environnement dans lequel se trouve un LT CD8 naïf influe sur la génération de SLEC et de MPEC. En effet, un même clone de LT CD8 naïf spécifique de l'antigène OVA donne naissance à une population préférentiellement enrichie en SLEC dans la rate et à une population préférentiellement enrichie en MPEC au niveau de l'épithélium intestinal (Plumlee et al., 2013).

Trois études mettent en évidence que des LT CD8 déficients pour le récepteur de chimiokine CXCR3 génèrent plus de LT CD8 mémoires à la suite d'infections par les VV, LCMV et Influenza (Kurachi et al., 2011; Hu et al., 2011; Kohlmeier et al., 2011). Des analyses histologiques révèlent une localisation anatomique différente des LT CD8 effecteurs WT et CXCR3<sup>-/-</sup> au niveau de la rate lors d'infections systémiques. Les LT CD8 effecteurs CXCR3<sup>-/-</sup> sont préférentiellement localisés dans la zone T de la pulpe blanche tandis que les LT CD8 effecteurs WT forment des clusters au niveau de la zone marginale (Kurachi et al., 2011; Hu et al., 2011). Cette différence de positionnement s'explique par un recrutement au

niveau de la zone marginale dépendant de la chimiokine CXCL9 (ligand de CXCR3). La zone marginale de la rate est une zone riche en cytokines pro-inflammatoires (IL-12 et IFN- $\gamma$ ) et en antigène. De manière intéressante, les LT CD8 effecteurs WT arborent un phénotype d'activation (CD69<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup>) durant une plus grande période, suggérant que ces cellules ont été plus fortement stimulées (Kurachi et al., 2011). Des observations similaires sont réalisées par Kohlmeier et collègues dans un contexte d'infection intranasal par le virus Influenza (Kohlmeier et al., 2011). Au sein du tissu pulmonaire, les LT CD8 effecteurs CXCR3<sup>-/-</sup> sont localisés dans le parenchyme tandis que les LT CD8 effecteurs WT sont préférentiellement localisés au contact des voies aériennes. De même, une faible proportion de LT CD8 effecteurs CXCR3<sup>-/-</sup> exprime le marqueur d'activation CD69 tandis que la majorité des LT CD8 effecteurs WT l'exprime. Ainsi, la plus grande génération de LT CD8 mémoires observée en absence d'expression de CXCR3 est probablement liée à un accès restreint des LT CD8 aux signaux inflammatoires et antigéniques (Kurachi et al., 2011; Hu et al., 2011).

- Les facteurs de transcription

La différenciation des LT CD8 activés en SLEC ou en MPEC est également régulée par l'expression d'un certain nombre de facteurs de transcription. Ces facteurs de transcription présentent la particularité de fonctionner par paire de manière antagoniste.

### *Tbet / Eomes*

Tbet et Eomes sont deux facteurs de transcription reconnaissant des motifs « T-box » sur la séquence d'ADN. Ces deux facteurs de transcriptions sont essentiels pour induire la différenciation des LT CD8 activés. En effet, ils contrôlent de manière redondante l'expression d'un certain nombre de gènes codant pour des molécules effectrices essentielles à la réponse T CD8, notamment la perforine, le granzyme B et l'IFN- $\gamma$  (Intlekofer et al., 2005; Cruz-Guilloty et al., 2009). Le niveau d'expression de Tbet et d'Eomes régule également la différenciation des LT CD8 activés. Joshi et collègues démontrent que l'induction d'une forte expression de Tbet favorise la différenciation en LT CD8 effecteurs à courte durée de vie (Joshi et al., 2007). A l'inverse, l'expression d'Eomes favorise la génération de MPEC et la différenciation en LT CD8 mémoires à longue durée de vie (Banerjee et al., 2010). La balance entre l'expression de Tbet et Eomes est finement régulée par des signaux environnementaux

tels que le niveau d'inflammation (Takemoto et al., 2006; Joshi et al., 2007). Ainsi, un LT CD8 recevant un signal inflammatoire important exprime préférentiellement Tbet tandis qu'un signal inflammatoire faible favorise l'expression d'Eomes. Rao et collègues ont identifié la kinase mTOR (mamalian Target Of Rapamycin) et le facteur de transcription Foxo1 comme des éléments clés dans la régulation de la balance Tbet/Eomes. En effet, des signaux inflammatoires tels que l'IL-12 activent mTOR, induisant l'inhibition de Foxo1 et l'expression de Tbet. A l'inverse, le traitement par la rapamycine (un inhibiteur pharmacologique de mTOR) de LT CD8 activés en présence d'IL-12 conduit à la levée de la répression de Foxo1, qui inhibe alors l'expression de Tbet et induit l'expression d'Eomes en se fixant directement au promoteur codant pour ce gène (Rao et al., 2010; 2012). Ces données expliquent, au moins en partie, pourquoi un traitement par la rapamycine durant la phase d'expansion d'une réponse T CD8 contre le virus LCMV permet d'augmenter significativement le nombre de MPEC et à terme le nombre de LT CD8 mémoires générés (Araki et al., 2009a). D'autres facteurs de transcription, notamment Runx3 et TCF-1, induisent l'expression préférentielle d'Eomes et la différenciation en LT CD8 mémoires à longue durée de vie (Zhou et al., 2010; Cruz-Guilloty et al., 2009). Enfin, il est intéressant de noter que Tbet est préférentiellement ségrégué dans la cellule fille proximale à la DC lors de la première division asymétrique d'un LT CD8 naïf, ce qui corrèle avec la différenciation préférentielle de cette cellule en SLEC (Chang et al., 2011).

### *Blimp-1 / Bcl-6*

Blimp-1 et Bcl-6 sont deux répresseurs transcriptionnels initialement décrit comme des régulateurs essentiels du développement des réponses immunitaires des LB (lymphocytes B). Blimp-1 favorise la différenciation terminale des LB activés en plasmocytes à courte durée de vie capable de sécréter des anticorps tandis que Bcl-6 permet la génération de LB mémoires au niveau des centres germinatifs. De nombreuses études rapportent que ce couple de facteurs de transcription est également impliqué dans la régulation des réponses immunitaires T CD8. En effet, la réponse immunitaire contre les virus LCMV et Influenza de LT CD8 déficients pour Blimp-1 conduits à la prédominance d'un phénotype MPEC au sein de la population effectrice et à la génération d'un plus grand nombre de LT CD8 mémoires (Kallies et al., 2009; Rutishauser et al., 2009). A l'inverse, l'infection de souris déficientes pour le gène *Bcl-6* conduit à la génération d'un nombre plus faible de LT CD8 mémoires (Ichii et al., 2002; 2004). De plus, au pic de la réponse immunitaire primaire T CD8, les SLEC contiennent de fort niveaux de Blimp-1 et de faible niveau de Bcl-6 et le phénotype

inverse est observé au sein de la population de MPEC. Ces données indiquent que lors des réponses T CD8, tout comme lors des réponses B, l'expression de Blimp-1 favorise la différenciation terminale en cellules effectrices tandis que l'expression de Bcl-6 favorise la génération de LT CD8 mémoires. La différenciation terminale des LT CD8 exprimant de fort niveau de Blimp-1 s'explique par la modification du programme génétique induit par ce facteur de transcription. Ainsi, Blimp-1 induit l'expression de gènes impliqués dans la différenciation en SLEC, notamment Tbet, et inhibe l'expression de gènes impliqués dans la différenciation en LT CD8 mémoires, notamment *Eomes*, *Bcl-6* et *Id3* (Rutishauser et al., 2009; Kallies et al., 2009; Ji et al., 2011). Enfin, Bcl-6 et Blimp-1 régulent la capacité de prolifération des LT CD8 mémoires lors d'une restimulation (Ichii et al., 2004; Manders et al., 2005). Ainsi il est important de noter que même si le niveau d'expression de ces deux facteurs de transcription détermine le devenir des LT CD8, leur expression n'est pas exclusive et chacun permet probablement d'induire des fonctions essentielles dans les SLEC et dans les MPEC.

### *Id2 / Id3*

Les facteurs de transcriptions Id2 et Id3 régulent l'expression d'un grand nombre de gène en inhibant la fixation sur l'ADN de facteurs de transcriptions reconnaissant des motifs « E-box ». En absence d'expression de Id2, les réponses T CD8 primaires sont abortives, les LT CD8 effecteurs prolifèrent peu et acquièrent rapidement un phénotype de LT CD8 mémoires (Cannarile et al., 2006). A l'inverse, l'absence d'expression de Id3 n'a pas d'impact sur la réponse T CD8 primaire mais conduit à la génération d'un nombre plus faible de LT CD8 mémoires. De plus, avant le pic de la réponse immunitaire primaire, la population de LT CD8 effecteurs présente une expression hétérogène de Id3. Les cellules Id3<sup>lo</sup> possèdent un phénotype de SLEC (KLRG1<sup>hi</sup> CD127<sup>lo</sup>) tandis que les cellules Id3<sup>hi</sup> ont un phénotype de MPEC (KLRG1<sup>lo</sup> CD127<sup>hi</sup>) (Yang et al., 2011). Par ailleurs, l'expression de Id3 est diminuée par Blimp-1 dans les SLEC (Ji et al., 2011). Ces données indiquent que Id2 et Id3 régulent également la différenciation des LT CD8. Néanmoins, à l'inverse des autres couples de facteurs de transcription impliqués dans la différenciation des LT CD8, il semble que le couple Id2 / Id3 agisse davantage sur la survie des LT CD8 plutôt que sur la modulation de leur programme de différenciation. En effet, l'expression de Id3 induit l'expression de gènes associés à la réplication, à la réparation et au maintien de la stabilité de l'ADN. De plus, l'expression forcée de Id3 dans des SLEC favorise leur survie (Ji et al., 2011).

D'autres facteurs de transcription semblent également impliqués dans la différenciation en SLEC ou en MPEC. Zeb2 est exprimé préférentiellement par les SLEC et un déficit de Zeb2 conduit à la diminution du nombre de SLEC sans affecter de manière significative la génération de MPEC (Omilusik et al., 2015). A l'inverse, TCF1 (T Cell Factor 1) semble favoriser la différenciation en MPEC (Zhou and Xue, 2012).

Pour conclure, de nombreux facteurs de transcription sont impliqués dans l'établissement de la différenciation en SLEC ou en MPEC. Néanmoins, la régulation de cette différenciation repose également sur l'interaction entre ces nombreux facteurs de transcription. Ce domaine est à l'heure actuelle encore mal connu. De même, les signaux permettant la régulation de l'expression de ces nombreux facteurs de transcription commencent à être identifiés.

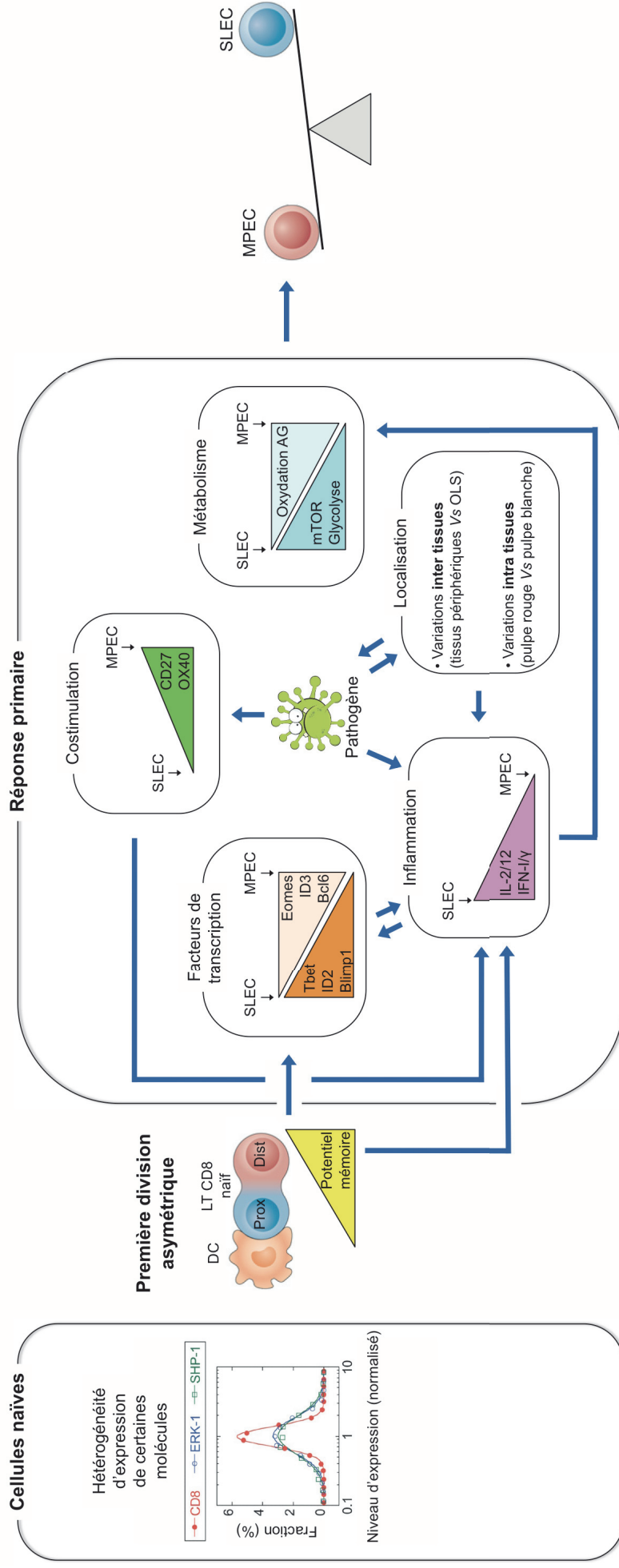
- Le métabolisme

Comme nous l'avons vu précédemment, les LT CD8 effecteurs possèdent un métabolisme anabolique, utilisant principalement la voie de la glycolyse aérobie, tandis que les LT CD8 mémoires, tout comme les LT CD8 naïfs, possèdent un métabolisme catabolique utilisant principalement la voie d'oxydation des acides gras. Deux études ont révélées l'impact de ce switch métabolique dans la régulation de la différenciation en LT CD8 mémoires.

En utilisant un modèle de souris présentant un déficit du gène TRAF6 uniquement au niveau des LT, Pearce et collègues démontrent que des LT CD8 TRAF6<sup>-/-</sup> produisent une réponse primaire normale lors d'une infection par Lm mais présentent un défaut de génération de LT CD8 mémoires. L'analyse par microarray de ces LT CD8 TRAF6<sup>-/-</sup> révèle que ces cellules présentent un déficit en gènes régulant le métabolisme oxydatif des acides gras, conduisant à une diminution de ce métabolisme dans ces cellules. L'injection de deux drogues augmentant le métabolisme des acides gras (métformine et rapamycine) durant la phase effectrice permet de restaurer la génération de LT CD8 mémoires TRAF6<sup>-/-</sup>. Cette étude démontre ainsi l'importance du switch métabolique dans la régulation de la différenciation en LT CD8 mémoires (Pearce et al., 2009).

Des résultats similaires ont été obtenus par Araki et collègues. Ils démontrent en effet que l'injection de rapamycine (inhibant mTOR) lors de la phase de prolifération clonale d'une réponse T CD8 contre le virus LCMV conduit à une augmentation importante du nombre de LT CD8 mémoires générés. De manière intéressante, l'injection de rapamycine durant la





**Figure 7 : Facteurs régulant la différenciation des LT CD8 naïfs en SLEC ou MPEC.**

L'hétérogénéité de la population de LT CD8 naïfs est un facteur pré-existant influant directement et indirectement sur la différenciation en SLEC ou en MPEC. Le niveau d'expression de certaines molécules impliquées dans l'activation (ex : CD8, ERK, SHP-1) varie d'un LT CD8 naïf à un autre. Chaque LT CD8 naïf possède un potentiel intrinsèque de différenciation en SLEC ou en MPEC. La première division asymétrique permet l'acquisition hétérogène d'un potentiel de différenciation en cellule mémoire entre la cellule fille proximale (Prox) et la cellule fille distale (Dist) à la DC. Ces facteurs précoces influent sur la sensibilité des cellules à de nombreux facteurs durant la réponse primaire. Ces facteurs influent également les uns sur les autres. L'influence d'un facteur sur un autre est matérialisée par les flèches bleues, sans précision quand à la nature de cette influence (positive ou négative). L'intégration de ces signaux régule la différenciation des LT CD8 naïfs en SLEC ou en MPEC.

phase de contraction n'augmente pas le nombre de LT CD8 mémoires générés mais accélère la transition depuis le stade effecteur vers le stade mémoire (Araki et al., 2009a).

La capacité d'un LT CD8 à effectuer le switch métabolique depuis la glycolyse vers le métabolisme des acides gras régule donc sa capacité de différenciation en LT CD8 mémoire. La kinase mTOR semble jouer un rôle crucial dans ce switch métabolique, favorisant la glycolyse aérobie au détriment de l'oxydation des acides gras. Ainsi, une faible activité mTOR favorisera la différenciation en LT CD8 mémoire.

La différenciation des LT CD8 en SLEC ou en MPEC est un processus multifactoriel, présentant de nombreux niveaux de régulation (**Figure 7**). La division cellulaire asymétrique semble être un événement précoce crucial dans l'établissement de la différenciation en SLEC ou en MEPC. Néanmoins, ce processus ne suffit pas à expliquer l'hétérogénéité inter-clonale révélée par plusieurs études. Ainsi, de nombreux facteurs (environnementaux et intrinsèques aux LT CD8) régulent la différenciation en SLEC ou en MPEC. Il est important de noter que ces facteurs influent également les uns sur les autres comme le montre le schéma figure 7. Ainsi, la régulation de la différenciation des LT CD8 activés en SLEC ou en MPEC est un processus complexe, agissant à différentes échelles (moléculaire, cellulaire et tissulaire). La compréhension fine de ce processus nécessitera l'utilisation d'outils de modélisation intégrant au cours du temps ces différents paramètres et échelles.

### c) La phase de contraction de la réponse immunitaire

Environ 8 à 10 jours après le début de l'infection, les LT CD8 effecteurs subissent une importante phase de contraction. Durant ce processus, entre 90 et 95% des LT CD8 effecteurs sont éliminés par apoptose. La faible proportion de cellules survivant à cette vague apoptotique massive sont les LT CD8 mémoires différenciés et qui persisteront dans l'organisme à l'état quiescent durant plusieurs années.

Lors d'infections aiguës, le déclenchement de la phase de contraction est concomitante avec l'élimination complète du pathogène (Badovinac and Harty, 2002), suggérant que la phase de contraction est directement liée à la disponibilité en antigène dans l'environnement. Garrod et collègues ont développés un système rapporteur de l'activité caspase 3 afin de détecter *in vivo* au cours d'une réponse immunitaire les LT CD8 qui entrent en apoptose (Garrod et al., 2012). Grâce à ce système, ils démontrent que lors d'une immunisation par le peptide OVA avec un adjuvant (LPS, Lipopolysaccharide), l'induction de la phase de contraction des LT CD8 OTI transférés semble effectivement dépendre de la quantité



d'antigène disponible dans l'environnement. En effet, une seconde injection (4 jours après immunisation) de peptide OVA permet de limiter cette phase de contraction (Garrod et al., 2012). Grace à leur modèle rapporteur de l'activité caspase 3, Garrod et collègues démontrent également que la contraction est un processus systémique, affectant de manière équivalente les LT CD8 effecteurs localiser dans différents tissus (OLS et tissus périphériques) (Garrod et al., 2012).

Plusieurs études vont néanmoins à l'encontre de cette hypothèse de dépendance à l'antigène. En 2001, Kaech et collègues activent *in vitro* des LT CD8 naïfs TCR transgéniques P14 spécifiques de l'épitope GP33 du virus LCMV et transfèrent ces cellules dans des souris naïves (exemptes d'antigène GP33). Ils démontrent alors que malgré l'absence d'antigène, les LT CD8 P14 transférés prolifèrent et se différencient en cellules effectrices. Plus important encore, ils observent que 8 jours après transfert, les cellules effectrices générées subissent une phase de contraction. L'instant de déclenchement de cette phase de contraction observée en absence d'antigène correspond exactement avec l'instant de déclenchement de la phase de contraction observée lorsque des LT CD8 naïfs P14 sont transférés dans des souris par la suite immunisées avec une souche de Lm exprimant l'épitope GP33 (Kaech and Ahmed, 2001). Ceci suggère que la phase de contraction est pré-programmée lors de l'activation des LT CD8. A partir de cette programmation, les LT CD8 activés fonctionneraient en auto-pilote. Des observations similaires sont réalisées par Badovinac et collègues. En effet, ils démontrent que lors d'infections par une souche atténuée de Lm, si la délivrance d'antibiotique 24h après infection diminue très rapidement le nombre de bactéries présent dans l'organisme, elle n'affecte pas la cinétique de déclenchement de la phase de contraction de la réponse T CD8 anti-Listeria, qui a toujours lieu 7 jours après infection. De même, si l'infection par le virus LCMV de souris BALB/c déficientes pour le gène codant pour la perforine conduit à une persistance de cette infection, le déclenchement de la phase de contraction de la réponse T CD8 anti-LCMV est inchangé comparé aux souris WT (Badovinac et al., 2002).

En revanche, Badovinac et collègues démontrent que le prétraitement de souris avec de l'ampicilline suivit d'infections par une souche atténuée de Lm abroge le déclenchement de la phase de contraction de la réponse T CD8 anti-Listeria. Cet effet est directement dépendant des signaux inflammatoires présent très tôt durant l'infection, en particulier de l'IFN- $\gamma$ . En effet, l'injection de CpG (un ligand du TLR9) au moment de l'infection permet d'induire la production des cytokines pro-inflammatoires IL-12, IFN- $\alpha$  et IFN- $\gamma$  et ainsi de restaurer cette phase de contraction (Badovinac et al., 2004).

Deux voies majeures permettent l'induction de l'apoptose dans les LT CD8 effecteurs durant la phase de contraction. La voie intrinsèque (ou mitochondriale) est régulée par les protéines anti- et pro-apoptotiques de la famille Bcl-2. La protéine pro-apoptotique Bim (Bcl-2 Interacting Mediator of death) joue un rôle crucial dans l'induction de cette voie d'apoptose dans les LT CD8 effecteurs. En effet, plusieurs études démontrent que lors d'infections aiguës par les virus LCMV et HSV ou lors d'injections d'un super antigène dérivé de la bactérie *Staphylococcus aureus*, des souris déficientes pour Bim présentent une phase de contraction de la réponse T CD8 très limitée, conduisant à la génération d'un plus grand nombre de LT CD8 mémoires (Hildeman et al., 2002; Pellegrini et al., 2003; Wojciechowski et al., 2006). De manière intéressante, le niveau d'expression de Bim ne varie pas au cours de l'activation des LT CD8. En revanche, le niveau d'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 diminue fortement après activation dans les LT CD8. Bcl-2 interagit avec Bim afin d'inhiber son encrage dans la membrane mitochondrial, conduisant au relargage du cytochrome c et à l'induction de l'apoptose. Ainsi, la quantité de signaux anti-apoptotiques reçus par un LT CD8 effecteur influe sur sa capacité à inhiber l'activation de Bim et ainsi à survivre à la phase de contraction (Green, 2008).

La voie extrinsèque d'induction de l'apoptose implique l'engagement de récepteurs à domaine de mort appartenant à la famille des récepteurs au TNF (notamment FAS) conduisant à l'induction de l'apoptose via la formation du DISC (Death-Inducing Signaling Complex) et l'activation de la caspase 8. Cette voie extrinsèque semble également avoir un rôle dans l'élimination des LT CD8 effecteurs durant la phase de contraction, via l'interaction entre Fas et FasL. En effet, lors d'infections chroniques par le virus MHV (Mouse  $\gamma$  Herpes Virus) ou lors d'infection aiguës par le virus LCMV, des souris déficientes pour Bim et Fas présentent une phase de contraction beaucoup plus faible et un nombre de LT CD8 mémoires plus important comparé à des souris WT ou mutantes pour un seul de ces gènes (Hughes et al., 2008; Weant et al., 2008). En revanche, dans le cas d'infections aiguës par le virus HSV, la phase de contraction de la réponse T CD8 dans des souris déficientes pour Fas est comparable à celle de souris WT (Pellegrini et al., 2003). Selon le modèle proposé par Green, ces deux voies d'induction de l'apoptose coopèreraient pour éliminer les LT CD8 effecteurs lors de la phase de contraction (Green, 2008). Dans un contexte d'infection aiguë, la diminution rapide de la quantité d'antigène disponible limite les signaux de survie reçus par les LT CD8 effecteurs, conduisant à leur élimination dépendante de Bim. A l'inverse, lors d'infections chroniques, la stimulation antigénique répétée des LT CD8 effecteurs favorise l'accumulation de signaux de survie inhibant l'induction de la voie intrinsèque. Cette stimulation antigénique persistante favorise également l'expression de FasL par les LT CD8

effecteurs. Deux scénarios sont alors envisageables. L'engagement de Fas à la surface des LT CD8 effecteurs pourrait conduire à l'élimination fratricide de ces cellules. A l'inverse, l'élimination, via l'engagement de Fas, des DC présentant l'antigène permettrait de diminuer la quantité de signaux de survie reçus par les LT CD8 effecteurs, conduisant à leur élimination via Bim.

En conclusion, la phase de contraction est un processus systémique, affectant de manière équivalente les LT CD8 effecteurs localisés dans différents tissus. Ce processus semble programmé très tôt durant l'activation de la réponse T CD8 (modèle auto-pilote) et est modulé par différents signaux environnementaux, tels que le contexte inflammatoire généré par l'infection et la disponibilité en antigène.

### **C. Caractéristiques des LT CD8 mémoires conventionnels**

A la suite de la phase de contraction, marquant l'aboutissement de la réponse immunitaire primaire, seuls survivent les LT CD8 mémoires générés. Cette population est composée de cellules spécifiques de différents antigènes provenant du pathogène ayant causé la réponse immunitaire primaire. Lors d'une seconde infection par le même pathogène, cette population de LT CD8 mémoires permettra de générer une réponse immunitaire secondaire plus rapide et plus efficace que la réponse primaire, conférant ainsi une protection accrue à l'organisme contre cet agent pathogène. Au cours de cette partie, nous allons identifier les différentes caractéristiques de la population de LT CD8 mémoires induits par antigène qui sont responsables de cette protection augmentée.

#### **1. Hétérogénéité**

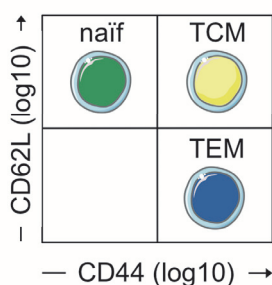
Comme nous l'avons vu précédemment, on différencie les LT CD8 mémoires des LT CD8 naïfs par l'expression de plusieurs marqueurs phénotypiques exprimés principalement par les cellules mémoires, tels que CD44 chez la souris ou CD45RO chez l'homme (**Tableau 1**). Néanmoins, la population de LT CD8 mémoires présente une importante hétérogénéité caractérisée par l'expression hétérogène de nombreux marqueurs phénotypiques. Ainsi, basé sur l'expression hétérogène de certains marqueurs phénotypiques, plusieurs sous-populations de LT CD8 mémoires possédant des propriétés fonctionnelles différentes ont été définies.

**A**

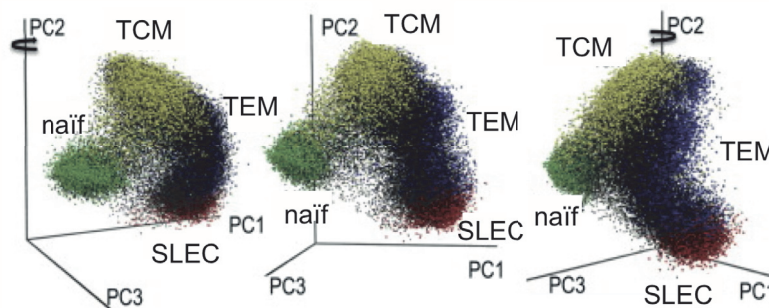
Sous population	Phénotype	Propriétés fonctionnelles	Localisation anatomique
TCM	CD44 <sup>hi</sup> , CD62L <sup>+</sup> , CCR7 <sup>+</sup> , CD69 <sup>-</sup> , CD103 <sup>-</sup>	IL-2 : ++ , GzmB : + IFN-γ : +, Prolifération : ++	Circulation entre OLS
TEM	CD44 <sup>hi</sup> , CD62L <sup>-</sup> , CCR7 <sup>-</sup> , CD69 <sup>-</sup> , CD103 <sup>-</sup>	IL-2 : + , GzmB : ++ IFN-γ : ++, Prolifération : +	Circulation entre tissus périphériques
TRM	CD44 <sup>hi</sup> , CD62L <sup>-</sup> , CCR7 <sup>-</sup> , CD69 <sup>+</sup> , CD103 <sup>+</sup>	IL-2 : + , GzmB : ++ IFN-γ : ++, Prolifération : +	Résidence dans tissus périphériques

**B**

Cytométrie conventionnelle  
(2 paramètres)



CyTOF  
(25 paramètres)



**Figure 8 : Hétérogénéité de la population de LT CD8 mémoires conventionnels.**

(A) Tableau présentant les caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles des principales sous populations de LT CD8 mémoires conventionnels identifiées.

(B) Comparaison de l'hétérogénéité de la population de LT CD8 mémoires conventionnels, révélée par la cytométrie en flux classique (panel gauche) et par la technologie CyTOF (panel droit). Les données de CyTOF sont présentées en Analyse en Composante Principale 3D (ACP). Cette analyse permet d'identifier les 3 variables (PC1, PC2 et PC3) expliquant le plus la variabilité observée entre les différentes cellules et de les représenter dans un espace à trois dimensions. On remarquera que la cytométrie classique définit clairement un nombre très restreint de sous-populations tandis que la technologie CyTOF, utilisant un plus grand nombre de paramètres, révèle l'existence d'un nombre beaucoup plus important de sous-populations dont la définition est plus subtile.

Sallusto et collègues furent les premiers à décrire chez l'homme deux sous-populations de LT CD8 mémoires (**TCM** pour T Central Memory et **TEM** pour T Effector Memory) basé sur l'expression différentielle de CD62L et CCR7 (Sallusto et al., 1999) (**Figure 8A**). Ces sous-populations de LT CD8 mémoires sont conservées chez la souris (Masopust et al., 2001). Les TCM sont principalement localisés au niveau des OLS. Lors d'une restimulation par l'antigène dont ils sont spécifiques, les TCM prolifèrent rapidement et produisent de l'IL-2. A l'inverse, les TEM possèdent la capacité de circuler entre les différents tissus périphériques (poumon, foie, intestin). Lors d'une restimulation par l'antigène dont ils sont spécifiques, les TEM prolifèrent peu et produisent rapidement de l'IFN- $\gamma$  et des molécules cytotoxiques (Sallusto et al., 1999; Wherry et al., 2003; Masopust et al., 2001). Des expériences de parabiose (consistant à connecter les systèmes sanguins de deux souris, une naïve et une immunisée) ont permis de mettre en évidence que certains TEM possèdent la capacité de résider de manière permanente dans des tissus périphériques (poumon, peau, utérus, intestin et cerveau). Contrairement aux TEM, ces TRM (Tissue Resident Memory) sont généralement caractérisés par l'expression du marqueur d'activation CD69 et de l'intégrine  $\alpha E\beta 7$  (CD103), bien que certains TRM n'expriment cette intégrine (Bergsbaken and Bevan, 2015; Jiang et al., 2012; Laidlaw et al., 2014; Wakim et al., 2010; McMaster et al., 2015; Sheridan et al., 2014) (**Figure 8A**). De part leur localisation anatomique, les TRM constituent la première ligne de défense contre l'infection par des agents pathogènes. En effet, la réactivation des TRM par reconnaissance de l'antigène dont ils sont spécifiques permet d'induire très rapidement une réponse immunitaire efficace contre un pathogène n'ayant jamais été rencontré par l'organisme. En produisant très rapidement différentes cytokines, notamment de l'IFN $\gamma$ , de l'IL-2 et du TNF- $\alpha$ , les TRM induisent l'activation des cellules NK, la maturation des DC et le recrutement d'autres LT CD8 mémoires au niveau du site d'infection (Schenkel, 2014; Ariotti et al., 2014).

Il est important de noter que la classification TCM/TEM/TRM constitue probablement une simplification de l'hétérogénéité du pool de LT CD8 mémoires. En effet, l'étude de l'expression de plusieurs marqueurs phénotypique révèle l'existence de nombreux autres sous-populations cellulaires (Appay et al., 2008; Jameson and Masopust, 2009). Par exemple, l'étude récente de Böttcher et collègues démontre que l'expression du récepteur à la fractalkine (CX3CR1) permet de distinguer deux populations de LT CD8 mémoires ayant des capacités fonctionnelles différentes. Très rapidement après activation, les LT CD8 mémoires CX3CR1<sup>hi</sup> ré-acquièrent des fonctions effectrices telles que l'expression de granzyme B tandis que les LT CD8 mémoires CX3CR1<sup>lo</sup> prolifèrent rapidement et produisent de l'IL-2.

De manière intéressante, cette classification de cellules mémoires n'est pas redondante avec la classification TCM/TEM, puisque des cellules CX3CR1<sup>hi</sup> et CX3CR1<sup>lo</sup> sont retrouvées dans chacune de ces sous-populations (Böttcher et al., 2015). De même, Ikono et collègues ont également décrit chez la souris trois sous-populations de LT CD8 mémoires basé sur l'expression différentielle des marqueurs CD43, CD27, CD127 et CXCR3 (Hikono et al., 2007). Ces sous-populations, non redondantes avec la classification TCM/TEM, possèdent des caractéristiques fonctionnelles différentes, comme la capacité à produire une réponse secondaire efficace. L'étude de Newell et collègues constitue une très bonne démonstration de la simplification induite par l'utilisation des méthodes de phénotypage classiques, notamment la cytométrie en flux qui ne permet d'analyser qu'un nombre restreint de paramètres (Newell et al., 2012). En utilisant la technologie de la cytométrie en flux couplée à celle de la spectrométrie de masse (CyTOF), Newell et collègues analysent l'expression de 25 marqueurs phénotypiques et fonctionnels sur des LT CD8 humains. L'analyse en composante principale 3D des résultats obtenus est particulièrement édifiante. En effet, le pool de LT CD8 de phénotype mémoire n'est pas composé de sous-populations distinctes, comme le suggèrent les analyses par cytométrie en flux classique, mais est plutôt constitué d'une seule population présentant un continuum de phénotype (Newell et al., 2012). Bien que les TCM et TEM soient situés à des niveaux distincts du continuum de cellules mémoires, les cellules exprimant ces marqueurs ne forment pas de populations distinctes (**Figure 8B**).

## 2. Fréquence augmentée de cellules spécifiques d'un antigène

La première caractéristique associée à la génération de la mémoire immunitaire est l'augmentation de la fréquence de cellules spécifiques d'un antigène donné. Par exemple, Blattman et collègues démontrent chez la souris qu'au sein de la population de LT CD8 naïfs, environ 200 cellules possèdent un TCR spécifique de l'antigène GP33 du virus LCMV. Après une réponse immunitaire primaire contre ce virus, c'est environ  $5 \times 10^5$  cellules spécifiques de l'antigène GP33 qui sont retrouvées au sein de la population de LT CD8 mémoires, soit une augmentation de près de 2500 fois du nombre de cellules spécifiques de cet antigène (Blattman et al., 2002). En conséquence, lors d'une seconde infection par le même pathogène, la probabilité qu'un antigène dérivé du pathogène soit reconnu spécifiquement par des LT CD8 est grandement augmentée (Harty and Badovinac, 2008).



### 3. Maintien à long terme

Le maintien à long terme des LT CD8 mémoires est crucial pour conférer à l'organisme une protection efficace et durable (Lau et al., 1994). Contrairement aux LT CD8 naïfs, la survie des LT CD8 mémoires ne dépendent pas de stimulation du TCR par des complexes CMH-I/antigène du soi. En revanche, le signal délivré par l'IL-7 permet d'induire l'expression de protéines anti-apoptotiques, notamment Bcl-2, favorisant la survie de ces cellules (Murali-Krishna et al., 1999; Tan et al., 2002; Schluns et al., 2000). Néanmoins, comparé aux LT CD8 naïfs, l'état de quiescence des LT CD8 mémoires peut être qualifié d'actif. En effet, en ajoutant du BrdU (un agent intercalant de l'ADN) dans l'eau de boisson de souris ayant préalablement générées des LT CD8 mémoires contre une infection par le virus VSV, Schluns et collègues démontrent que ces LT CD8 mémoires incorporent fortement le BrdU, indiquant que ces cellules sont en division. Une telle prolifération homéostatique basale n'est pas observée au sein de la population de LT CD8 naïfs (Schluns et al., 2002). La prolifération homéostatique basale des LT CD8 mémoires participe au maintien à long terme de ces cellules et est dépendante de signaux environnementaux, notamment de l'IL-15. En effet, le transfert de LT CD8 mémoires OTI dans des souris déficiente pour l'IL-15 conduit à l'absence de prolifération de ces cellules (Goldrath et al., 2002; Tan et al., 2002). L'IL-15 est une cytokine produite par de nombreux types cellulaires et possède la particularité d'être trans-présentée notamment par les DC via la chaîne  $\alpha$  du récepteur à l'IL-15. Cette cytokine est reconnue et transduit un signal dans les LT CD8 mémoires via les chaînes  $\beta$  et  $\gamma$  du récepteur à l'IL-15. Cette trans-présentation de l'IL-15 peut être mimée via une protéine recombinante composée de deux chaînes  $\alpha$  du récepteur à l'IL-15 associées à un fragment Fc d'un anticorps humain IgG1 (Votavova et al., 2014). Ainsi, l'injection dans des souris d'un mélange de cette protéine recombinante avec de l'IL-15 permet d'augmenter significativement la prolifération homéostatique des LT CD8 mémoires, confirmant l'influence de cette cytokine sur le maintien des LT CD8 mémoires (Rubinstein et al., 2006). Bien que la prolifération homéostatique basale des LT CD8 mémoires soit observée dans différents organes, il semble que la moelle osseuse constitue une niche particulièrement favorable à ce processus et donc au maintien des LT CD8 mémoires (Parretta et al., 2005; Becker et al., 2005; Di Rosa and Pabst, 2005).

Le maintien des LT CD8 mémoires dans l'organisme dépend donc de l'intégration de signaux de survie délivrés par l'IL-7, et de leur capacité à s'auto-renouveler par un mécanisme de prolifération homéostatique basale dépendant de l'IL-15.

#### 4. Etat hyper-répondeur

Après engagement de leur TCR, les LT CD8 mémoires réacquièrent très rapidement leurs fonctions effectrices. En effet, une stimulation du TCR des LT CD8 mémoires durant seulement quelques heures suffit à induire une importante production de cytokines (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ), de chimiokines (CCL1/3/4/5/9) ainsi que l'expression des molécules cytotoxiques (perforine et granzyme) (Walzer et al., 2003; Catalfamo et al., 2004) (Djebali, 2015, Article soumis). Cet état hyper-répondeur dans lequel sont maintenus les LT CD8 mémoires contraste très fortement avec l'état hypo-répondeur des LT CD8 naïfs et s'explique en partie par des modifications épigénétiques influant sur l'expression des gènes. Certaines de ces modifications épigénétiques modifient l'état de condensation de la chromatine. Une chromatine condensée (hétérochromatine) inhibera l'expression des gènes en restreignant l'accès au promoteur tandis qu'une chromatine décondensée (euchromatine) favorisera l'accès au promoteur et donc l'expression des gènes.

##### a) Modification post-traductionnelle des histones

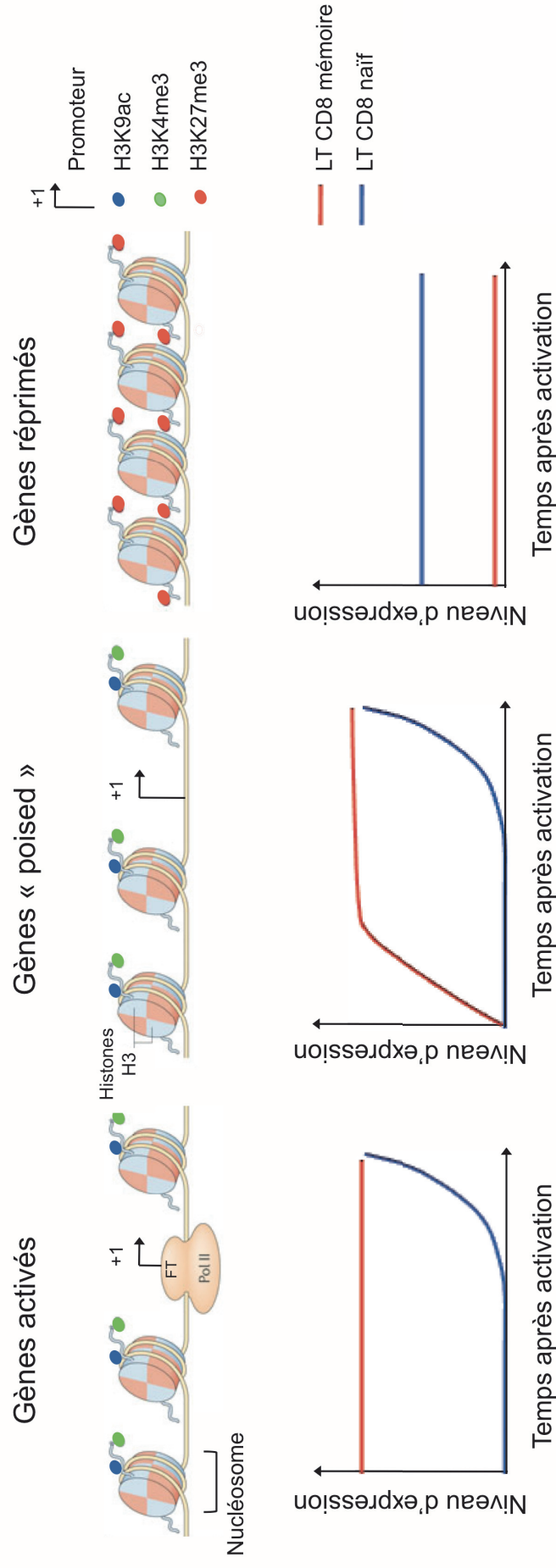
Plusieurs types de modifications post-traductionnelles des histones sont connues pour réguler l'expression des gènes. L'acétylation des queues N-terminales des histones est un processus régulé par deux types d'enzymes, des histones acetyltransferases (HAT) et des histones desacetylases (HDAC). Cette modification épigénétique permet généralement l'activation de la transcription (Lim et al., 2013). De manière intéressante, l'hyper-acétylation des lysines n°9 des histones H3 est fréquemment identifiée dans les LT CD8 mémoires, en particulier au niveau des promoteurs des gènes codant pour l'IFN- $\gamma$ , l'IL-2, la perforine et le granzyme (Denton et al., 2011). Le fort niveau d'acétylation des ces promoteurs corrèle avec l'expression rapide des gènes qu'ils contrôlent. En effet, le traitement de LT CD8 naïfs par un inhibiteur de HDAC conduit à une expression plus rapide du granzyme A lors de la stimulation du TCR de ces cellules (Fann et al., 2006). A l'inverse, des LT CD8 mémoires générés en absence de help-CD4 ne sont pas capables de produire rapidement de l'IFN- $\gamma$  après engagement de leur TCR, ce qui corrèle avec une hypo-acétylation du promoteur de ce gène (Northrop et al., 2006). Le traitement de tels LT CD8 mémoires par un inhibiteur de HDAC permet de restaurer la production rapide d'IFN- $\gamma$  après engagement du TCR (Northrop et al., 2008).



La méthylation des queues N-terminales des histones est également une modification épigénétique impliquée dans la régulation de l'expression des gènes. La position du résidu arginine ou lysine méthylé ainsi que le nombre de méthylation observées sur ce résidu (mono, di ou tri méthylation) influence positivement ou négativement la transcription des gènes. De manière générale, la tri-méthylation de la lysine n°4 des histones H3 (H3K4me3) permet l'activation de la transcription tandis que la tri-méthylation de la lysine n°27 des histones H3 (H3K27me3) conduit à l'inhibition de la transcription (Lim et al., 2013). Dans des LT CD8 mémoires, Denton et collègues observent une augmentation de la proportion de motif H3K4me3 et une diminution de la proportion de motif H3K27me3 au niveau des promoteurs des gènes codants pour l'IFN- $\gamma$  et le TNF- $\alpha$  (Denton et al., 2011). L'étude de Araki et collègues est particulièrement informative sur la relation entre méthylation des histones et expression des gènes dans les LT CD8 mémoires. Ils effectuent sur des LT CD8 naïfs et mémoires humains une immunoprécipitation de chromatine associée aux motifs H3K4me3 et H3K27me3 suivi d'un séquençage. En parallèle, une analyse du transcriptome de ces deux populations de cellules (à l'état quiescent et après restimulation à l'aide d'anticorps anti-CD3 et CD28) est réalisée par microarray. Ils démontrent une corrélation importante entre le niveau d'expression des gènes et le résidu lysine méthylé sur les histones H3. Ainsi, les gènes présentant un niveau élevé de motif H3K4me3 sont fortement exprimés tandis que les gènes présentant un niveau élevé de motif H3K27me3 sont faiblement exprimés (Araki et al., 2009b). De même, ils démontrent que les promoteurs de gènes typiquement exprimés par des LT CD8 mémoires (ID2, Blimp-1) sont enrichis en motifs H3K4me3 et appauvris en motif H3K27me3 comparé aux LT CD8 naïfs.

#### b) Demethylation des ilots CpG

La méthylation de l'ADN est également une modification épigénétique régulant l'expression des gènes. De manière générale, un faible niveau de méthylation de l'ADN favorise la transcription des gènes tandis qu'un fort niveau de méthylation l'inhibe. La méthylation a généralement lieu sur une cytosine qui précède une guanine. Les ilots CpG sont des séquences d'ADN d'au moins 200 paires de bases riches en cytosine et guanine, généralement retrouvés au niveau des promoteurs des gènes. De part leur composition, ces ilots CpG sont des sites de méthylation préférentiels. Des ilots CpG hypo-méthylés sont généralement observés au niveau du promoteur d'un gène exprimé (Lim et al., 2013). Plusieurs études démontrent ainsi que dans les LT CD8 mémoires comparé aux LT CD8 naïfs, les promoteurs des gènes codants pour la perforine, l'IFN- $\gamma$  et l'IL-2 sont hypo-



**Figure 9 : Modifications épigénétiques permettant l'acquisition de l'état hyper répondeur des LT CD8 mémoires conventionnels.**

Schéma représentant à l'état quiescent le promoteur de gènes activés, prêts à être transcrit (poised) et réprimés. La quantité de nucléosome, les modifications post traductionnelles des histones ainsi que la présence de la machinerie de transcription sont représentés. On remarquera que les gènes activés possèdent une faible densité de nucléosomes, ainsi que des histones H3 portant des modifications épigénétiques de type acétylation et méthylation H3K4me3. Ceci conduit à un état décondensé de la chromatine, favorisant l'accessibilité du promoteur pour la machinerie de transcription. Une conformation similaire est observée pour les gènes poised, sans que la machinerie de transcription soit recrutée au niveau du promoteur. Enfin, les gènes réprimés possèdent une grande quantité de nucléosomes associée à une méthylation H3K27me3. Ceci favorise un état condensé de la chromatine, restreignant l'accessibilité du promoteur. Schéma modifié d'après (Weng et al., 2012).

méthyles (Kersh et al., 2006; Lu et al., 2003). De plus, le traitement de LT CD8 naïfs par un inhibiteur de méthyltransferases conduit à une expression plus rapide de l'IFN- $\gamma$  lors de la stimulation du TCR de ces cellules (Kersh et al., 2006).

### c) Conséquence sur l'expression des gènes

Ces différentes modifications épigénétiques sont induites lors de la réponse immunitaire primaire et sont conservées dans les LT CD8 mémoires quiescents afin de maintenir un état hyper-répondeur. Ainsi, certains gènes codant pour des fonctions effectrices sont maintenus dans un état activé et sont donc constitutivement exprimés à faible niveau par les LT CD8 mémoires quiescents (**Figure 9**). C'est notamment le cas du gène codant pour la chimiokine CCL5. Cette chimiokine est produite très rapidement (1h) par les LT CD8 mémoires conventionnels après engagement de leur TCR (Walzer et al., 2003). Cette production extrêmement rapide s'explique par une expression constitutive du gène codant pour CCL5 dans les LT CD8 mémoires. Il en résulte le maintien d'un stock d'ARNm CCL5, de stabilité augmentée, prêt à être transcrit, ainsi qu'un stock de protéine CCL5 maintenu dans des granules de sécrétion (Marçais et al., 2006b; Catalfamo et al., 2004). A l'inverse, d'autres gènes sont prédestinés à être transcrit à la prochaine activation (« poised » en anglais). Ces gènes présentent généralement une structure de chromatine décondensée présentant des motifs H3K9ac et H3K4me3. La structure particulière de ces gènes permet d'induire leur transcription immédiatement dès l'activation des LT CD8 mémoires par engagement de leur TCR (**Figure 9**). Cette famille de gènes regroupe entre autres les gènes codant pour l'IFN- $\gamma$ , l'IL-2, le granzyme et la perforine (Fann et al., 2006; Araki et al., 2008). Enfin, certains gènes sont réprimés dans les LT CD8 mémoires. Ces gènes présentent une structure de chromatine condensée, présentant des motifs H3K27me3. Cette structure limite l'accèsibilité du promoteur pour la machinerie de transcription (**Figure 9**).

En conclusion, de nombreuses modifications épigénétiques, acquises au moment de la réponse immunitaire primaire, participent au maintien de l'état hyper répondeur des LT CD8 mémoires en modifiant l'expression de nombreux gènes. Cet état hyper répondeur est une propriété fondamentale des LT CD8 mémoires, contribuant significativement à la plus grande rapidité et efficacité de la réponse secondaire.

Récepteurs	Ligand(s)	Fonction	Références
NKG2D	Rae1 $\alpha/\beta/\gamma/\epsilon$ , H60a/b/c, Mult1	A	(Bauer et al., 1999)
KLRG1	E-cadhérine	I	(Thimme et al., 2005)
NKG2A - CD94	Qa-1 <sup>b</sup> - Qdm	I	(McMahon et al., 2002)
NKG2C/E – CD94	Qa-1 <sup>b</sup> - Qdm	A	(Gumá et al., 2005)
Ly49A	CMH-I conventionnel	I	(Rahim, 2014)
Ly49C/I			
Ly49F			
Ly49G2			

**Tableau 4 : Principaux récepteurs NK exprimés par les LT CD8 mémoires conventionnels.**

Pour chaque récepteur, les ligands identifiés ainsi que la nature du signal transmis par l'engagement du récepteur (A : activateur, I : Inhibiteur) sont indiqués.

Qa-1<sup>b</sup> – Qdm : CMH-I non conventionnel liant le peptide Qdm, issu de la dégradation de la séquence signal de CMH-I conventionnel.

## 5. Réponses de type innées des LT CD8 mémoires

Les LT CD8 mémoires expriment un ensemble de récepteurs leur conférant la capacité de répondre à des stimulations autres que l'engagement de leur TCR. En réponse à ces stimulations, les LT CD8 mémoires vont être activés et produire des molécules effectrices. Ce type de réponse des LT CD8 mémoires est qualifié d'inné, car ces cellules produisent des molécules effectrices indépendamment de la reconnaissance des antigènes dont elles sont spécifiques.

### a) Réactivité augmentée à l'IL-12 et l'IL-18

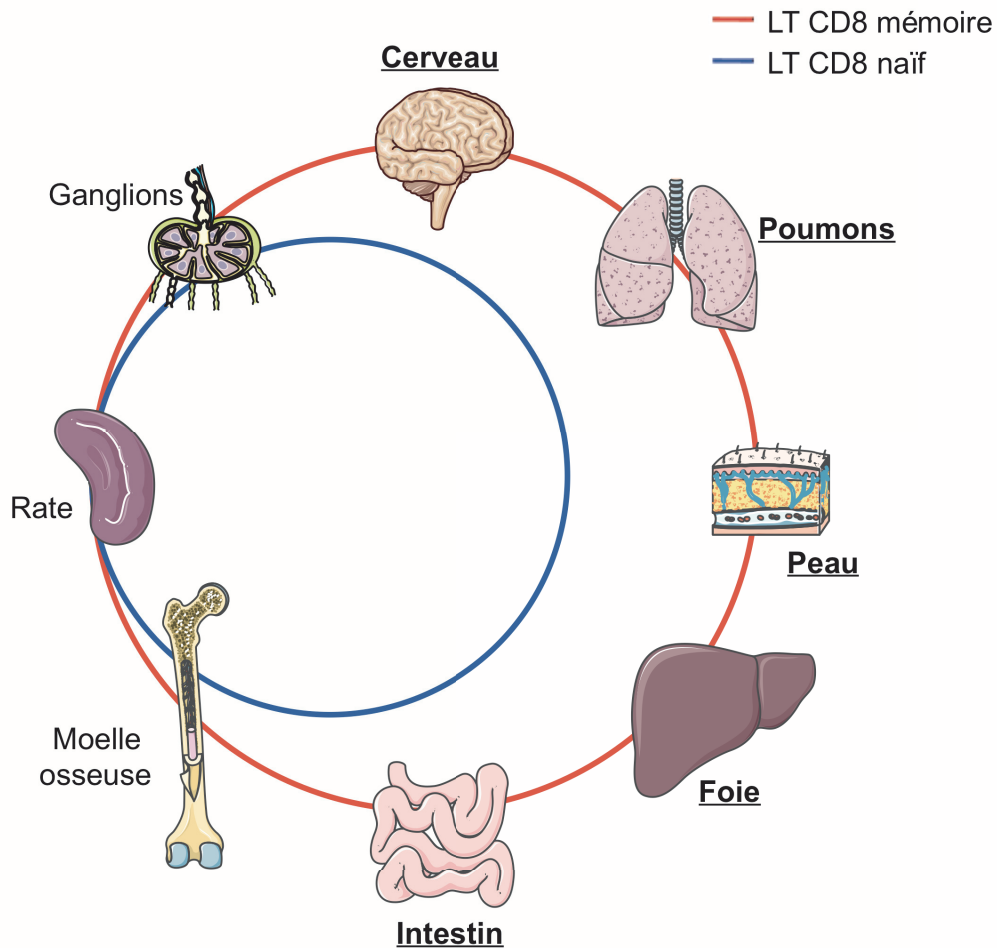
Certains signaux cytokiniques ont la capacité d'activer les LT CD8 mémoires conventionnels indépendamment de l'engagement de leur TCR. En effet, plusieurs études *in vitro* et *in vivo* démontrent que la stimulation de LT CD8 mémoires par les cytokines IL-12 et IL-18 conduit à la production très rapide (3 heures) d'IFN- $\gamma$  par ces cellules, malgré l'absence d'engagement de leur TCR (Berg et al., 2002; Lertmemongkolchai et al., 2001; Kambayashi et al., 2003; Raué et al., 2004). Cette réactivité augmentée vis à vis de l'IL-12 et de l'IL-18 s'explique par l'augmentation de l'expression des récepteurs pour ces deux cytokines dans les LT CD8 mémoires comparé aux LT CD8 naïfs (Berg et al., 2003). En plus de la production d'IFN- $\gamma$ , la stimulation par l'IL-12 et l'IL-18 induit la prolifération des LT CD8 mémoires, ainsi que l'expression rapide de molécules cytotoxiques, notamment la perforine et le granzyme B. Ainsi, des LT CD8 mémoires stimulés par IL-12/IL-18 sont également capables de lyser des cellules cibles *in vitro* (Raué et al., 2013; Soudja et al., 2012). Cette réactivité augmentée des LT CD8 mémoires vis à vis de l'IL-12 et de l'IL-18 leur permet de participer aux réponses immunitaires innées peu importe le pathogène (virus, bactéries, parasites) causant l'infection (Raué et al., 2013; Soudja et al., 2012; Berg et al., 2003).

### b) Expression de récepteurs de cellules NK

Contrairement aux LT CD8 naïfs, les LT CD8 mémoires conventionnels expriment une large panoplie de récepteurs associés aux cellules NK (Natural Killer) (**Tableau 4**). Les

cellules NK sont des lymphocytes de l'immunité innée, capable de lyser des cellules cibles par cytotoxicité. On distingue deux types de récepteurs NK : ceux dont l'engagement par leurs ligands conduit à l'induction d'un signal activateur (récepteurs activateurs) et ceux dont cet engagement conduit à l'induction d'un signal inhibiteur (récepteurs inhibiteurs). La balance entre les signaux activateurs et inhibiteurs émanant de ces différents récepteurs régule la fonction biologique des cellules NK. Ainsi, lors d'un contact avec une cellule, un excès de signal positif ou un déficit de signal négatif conduit à l'activation de la cellule NK et à la lyse de la cellule cible. Le récepteur activateur NKG2D (natural-killer group 2, member D) est l'un des récepteurs NK exprimés par les LT CD8 mémoires conventionnels les mieux caractérisés. Ce récepteur est un homodimère qui, lorsqu'il est exprimé par les LT CD8 mémoires conventionnels, est associé à la protéine adaptatrice intracystoplasmique DAP-10 (DNAX-Activating Protein) (Diefenbach et al., 2002). Neufs ligands de ce récepteur (Rae1 $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ , H60a, b, c, Mult1) ont été caractérisés chez la souris. Ces ligands sont exprimés en condition de stress cellulaire, par exemple lors d'infections virales ou lors de transformations tumorales (Lanier, 2015). Des études *in vitro*, mimant l'engagement de NKG2D grâce à un anticorps dirigé contre ce récepteur, rapportent que l'engagement du récepteur NKG2D concomitant avec un signal TCR permet d'abaisser le seuil d'activation du TCR et augmente la production de cytokines, en particulier IFN- $\gamma$  et TNF- $\alpha$ , par des LT CD8 effecteurs (Diefenbach et al., 2002; Whitman and Barber, 2015). Le signal transmit par l'engagement de NKG2D permet également l'expression de la protéine anti-apoptotique Mcl-1, favorisant la survie des LT CD8 effecteurs et la génération de cellules mémoires (Wensveen et al., 2013).

Comme pour les cellules NK, l'engagement de NKG2D conduit à l'élimination de cellules cibles par les LT CD8 indépendamment de l'engagement de leur TCR. Par exemple, Talebian et collègues démontrent que des LT CD8 issus de patients atteints de myélome sont capables de lyser des cellules de myélome indépendamment du CMH mais de manière dépendante de NKG2D (Talebian et al., 2014). Cet effet est également documenté par plusieurs études utilisant des modèles d'activation bystander de LT CD8 mémoires via des infections par des pathogènes hétérologues (Sckisel et al., 2014; Chu et al., 2013; Crosby et al., 2014). Ces études démontrent que les ligands de NKG2D sont exprimés très rapidement après infection et que des LT CD8 mémoires activés de manière bystander (indépendamment de l'engagement de leur TCR) expriment NKG2D et participent activement au contrôle précoce de l'infection mais également au développement d'immunopathologie via un mécanisme dépendant de l'engagement de NKG2D. De même, l'inactivation du signal NKG2D via l'expression constitutive d'un ligand humain de ce récepteur (MICA) conduit à un défaut d'élimination de tumeurs par des LT CD8 mémoires (André et al., 2012). Ainsi,



**Figure 10 : Localisation anatomique des LT CD8 mémoires conventionnels.**

La localisation anatomique des LT CD8 naïfs (cercle bleu) et des LT CD8 mémoires conventionnels (cercle rouge) est indiquée. Les cellules naïves et mémoires circulent entre ces différents organes via les systèmes lymphatiques et sanguins, matérialisés par les traits entre les organes. Pour les LT CD8 mémoires, certaines sous populations de cellules (TRM) résident de manière permanente dans certains tissus périphériques, identifiés en gras et soulignés.



l'expression de NKG2D par les LT CD8 mémoires conventionnels leur permet d'acquérir une autre fonction innée, celle de pouvoir éliminer, de manière indépendante de l'engagement de leur TCR, des cellules infectées ou tumorales par cytotoxicité. Ce mécanisme pourrait jouer un rôle non négligeable dans le contrôle d'infections par des pathogènes hétérologues.

## 6. Accès aux tissus périphériques

La localisation anatomique des LT CD8 mémoires diffère radicalement de celle des LT CD8 naïfs. En effet, en plus des OLS, ces cellules sont également localisées dans de nombreux tissus périphériques, qui sont généralement la porte d'entrée de l'agent pathogène (**Figure 10**). Néanmoins comme nous l'avons vu précédemment, la capacité des LT CD8 mémoires à accéder aux tissus périphériques semble restreinte à certaines sous-populations de cellules.

Contrairement aux LT CD8 naïfs, les LT CD8 effecteurs et mémoires expriment plusieurs récepteurs de chimiokines pro-inflammatoires, notamment CCR5 (récepteur de CCL3/4/5) et CXCR3 (récepteur de CXCL9/10/11) (**Tableau 5**). L'expression de ces récepteurs permet aux LT CD8 effecteurs et mémoires de migrer contre des gradients de ces chimiokines qui sont abondamment produites au niveau des tissus périphériques infectés (Kohlmeier et al., 2008). De plus, les chimiokines provenant des tissus inflammés sont associées aux glucosaminoglycanes sur la face luminale des endothéliums, véritables portes d'entrée des LT CD8 dans les tissus périphériques (Middleton et al., 2002). Ainsi, Kohlmeier et collègues démontrent que l'expression de CCR5 par les LT CD8 mémoires est essentiel pour permettre le recrutement rapide de ces cellules au niveau des voies aériennes pulmonaires lors d'une infection par le virus Influenza (Kohlmeier et al., 2008). De même, Slütter et collègues démontrent que l'accès des LT CD8 mémoires aux voies aériennes pulmonaires dépend de l'expression de CXCR3 par ces cellules. Cette localisation des LT CD8 mémoires est importante pour contrôler rapidement une infection pulmonaire secondaire (Slütter et al., 2013). L'expression de CXCR3 permet également le recrutement des LT CD8 effecteurs et mémoires au niveau de la peau et de l'appareil reproducteur femelle lors d'infections localisées par les virus HSV-1 et HSV-2 respectivement (Mackay et al., 2013; Nakanishi et al., 2009). C'est la production de cytokines telles que l'IFN- $\gamma$  et l'IFN-I au niveau des tissus périphériques infectés qui permet la production des chimiokines CXCL9 et CXCL10, induisant ainsi le recrutement de LT CD8 effecteurs/mémoires sur le lieu de l'infection (Nakanishi et al., 2009; Schenkel et al., 2013; Iijima and Iwasaki, 2015). Enfin, il



Récepteurs	Ligands	Expression des ligands	Références
VLA1 ( $\alpha 1\beta 1$ )	Collagène / Laminine	Poumons (voies aériennes)	(Ray et al., 2004)
VLA4 ( $\alpha 4\beta 1$ )	Vcam1 / fibronectine	Moelle osseuse, peau, cerveau	(Mazo et al., 2005; Sa et al., 2014)
LFA1 ( $\alpha L\beta 2$ )	Icam1	Général	(Nolz, 2015)
$\alpha 4\beta 7$	MadCam1	Intestin	(Berlin et al., 1993; Lefrancois et al., 1999; Hamann et al., 1994)
$\alpha E\beta 7$	E-cadhérine	Rétention dans tissus (cerveau, poumon, intestin, peau)	(Laidlaw et al., 2014; El-Asady et al., 2005; Masson et al., 2007; Wakim et al., 2010; Lee et al., 2011b; Casey et al., 2012)
L-sélectine (CD62L)	PNAAd (Peripheral Node Addressins)	OLS	(Nolz, 2015)
P-sélectine (CD62P)	PSGL-1 (P-selectin Glycoprotein Ligand 1)	Peau	(Fuhlbrigge et al., 1997; Schön et al., 2003)
E-sélectine (CD62E)	CD43, CD44, ESL1 (E-selectin ligand 1)	Peau	
CXCR6	CXCL16	Poumons, Foie	(Lee et al., 2011a)
CCR5	CCL3/4/5	Poumons (induits par inflammation)	(Kohlmeier et al., 2008)
CXCR3	CXCL9/10/11	Poumons (voies aériennes) OLS (pré positionnement) (induit par l'inflammation)	(Slütter et al., 2013; Kastenmüller et al., 2013; Sung et al., 2012)
CXCR4	CXCL12	Moelle osseuse, OLS	(Chaix et al., 2014; Mazo et al., 2005; Scimone et al., 2004)
CCR7	CCL19/21	OLS / Sortie des tissus périphériques	(Bromley et al., 2008; 2005; Debes et al., 2005; Jenrich et al., 2012)
CCR9	CCL25	Intestin	(Svensson et al., 2002)
CCR10	CCL27	Peau	(Reiss et al., 2001; Homey et al., 2002)

**Tableau 5 : Molécules impliquées dans la migration des LT CD8.**

Tableau présentant une liste non exhaustive des molécules impliquées dans la migration des LT CD8 au sein de l'organisme.

OLS : organes lymphoïdes secondaires.

est important de noter que l'expression de CXCR3 par les LT CD8 mémoires TCM permet également un repositionnement rapide de ces cellules au niveau des régions inter-folliculaires des ganglions lymphatiques lors d'une seconde infection. Ce repositionnement apparaît crucial dans l'élaboration de réponse T CD8 mémoires rapides (Sung et al., 2012; Kastenmüller et al., 2013).

En plus des récepteurs de chimiokine, l'accès aux tissus périphériques nécessite l'expression de différentes molécules impliquées dans l'adhésion cellulaire, notamment des intégrines ainsi que des ligands de sélectines (**Tableau 5**). En effet, l'inflammation induite dans un contexte infectieux a pour effet d'activer les endothéliums des vaisseaux sanguins qui expriment alors de nombreuses molécules d'adhésion, dont les sélectines E et P, mais également des ligands d'intégrines (Pober and Sessa, 2007). Le pattern d'expression de ces différentes molécules de homing (intégrines, ligands de sélectines et récepteurs de chimiokines) par les LT CD8 mémoires détermine leur tropisme tissulaire. Par exemple, l'expression de l'intégrine  $\alpha 4\beta 7$  ainsi que le récepteur de chimiokine CCR9 permet aux LT CD8 effecteurs d'accéder à l'intestin tandis que l'expression des ligands des sélectines E et P ainsi que des récepteurs de chimiokine CCR9 et CCR10 favorise une localisation au niveau de la peau. Le tropisme tissulaire des LT CD8 est déterminé très tôt, au moment de leur activation. La voie d'immunisation, plus que le type de pathogène causant l'infection, est importante pour élaborer le tropisme tissulaire des LT CD8. Ainsi, Jiang et collègues démontrent que des infections par voie orale ou intranasale avec le même rotavirus génèrent des populations de LT CD8 effecteurs localisées préférentiellement au niveau des plaques de Peyer dans l'intestin ou dans le poumon (Jiang et al., 2008). Les DC sont tout particulièrement impliquées dans ce processus de conditionnement du tropisme tissulaire des LT CD8. En effet, des DC provenant de ganglions lymphatiques drainant la peau induisent l'expression de molécules de homing pour la peau par les LT CD8 (ligands des sélectines E et P). A l'inverse, seules des DC provenant des plaques de Peyer sont capable de conditionner le tropisme tissulaire des LT CD8 vers l'intestin (Mora et al., 2003; 2005).

Ce conditionnement du tropisme tissulaire des LT CD8 semble dépendre de facteurs solubles produits par les DC (Dudda et al., 2005). Il est important de noter que malgré ce conditionnement, les LT CD8 mémoires semblent conserver une certaine plasticité au niveau de leur tropisme tissulaire. En effet, Mora et collègues démontrent que la stimulation *in vitro* de LT CD8 mémoires ayant un tropisme vers la peau par des DC isolées des plaques de Peyer conduit à une modification du tropisme tissulaire de ces cellules mémoires vers l'intestin (Mora et al., 2005). Ainsi, le tropisme tissulaire des LT CD8 mémoires ne semble pas fixe mais peut être reprogrammé lors d'une réactivation secondaire.

Contrairement aux LT CD8 naïfs, les LT CD8 mémoires expriment un ensemble de molécules permettant leur migration dans les tissus périphériques. Le pattern d'expression de ces molécules de homing détermine leur tropisme tissulaire. En se plaçant aux portes d'entrées des agents pathogènes, les LT CD8 mémoires contribuent à la protection rapide et efficace de l'organisme.

## **Conclusion II**

L'acquisition d'un signal TCR fort, couplé aux signaux de costimulation et d'inflammation, permet l'activation des LT CD8 naïfs et le déclenchement de la réponse immunitaire primaire. Cette réponse immunitaire primaire est marquée par la génération de LT CD8 mémoires conventionnels. Ces cellules, qui persistent durant plusieurs années dans l'organisme, possèdent de nombreuses fonctions améliorées par rapport aux LT CD8 naïfs. Ainsi, lors d'une seconde infection par le même pathogène, les LT CD8 mémoires conventionnels produisent une réponse secondaire plus rapide et plus efficace que la réponse primaire, amplifiant ainsi la protection de l'organisme.

Dans la suite de cette introduction, nous allons voir que la réception de certains signaux cytokiniques par des LT CD8 naïfs permet la génération d'une autre classe de LT CD8 mémoires indépendamment d'un engagement fort de leur TCR.

## **III. Lymphocytes T CD8 mémoires innés**

La reconnaissance spécifique d'un antigène provenant d'un pathogène ou d'une tumeur lors d'une réponse immunitaire primaire n'est pas l'unique moyen de générer des LT CD8 mémoires. En effet, des études démontrent depuis une quinzaine d'années que l'augmentation de certains signaux cytokiniques reçus par les LT CD8 naïfs peut conduire à l'acquisition de caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles de LT CD8 mémoires conventionnels. Par opposition aux LT CD8 mémoires conventionnels induits par antigène, ces LT CD8 mémoires sont qualifiés d'innés. En effet, nous verrons que la génération de ces cellules ne nécessite pas de contact préalable avec l'antigène dérivé de pathogène dont elles sont spécifiques.

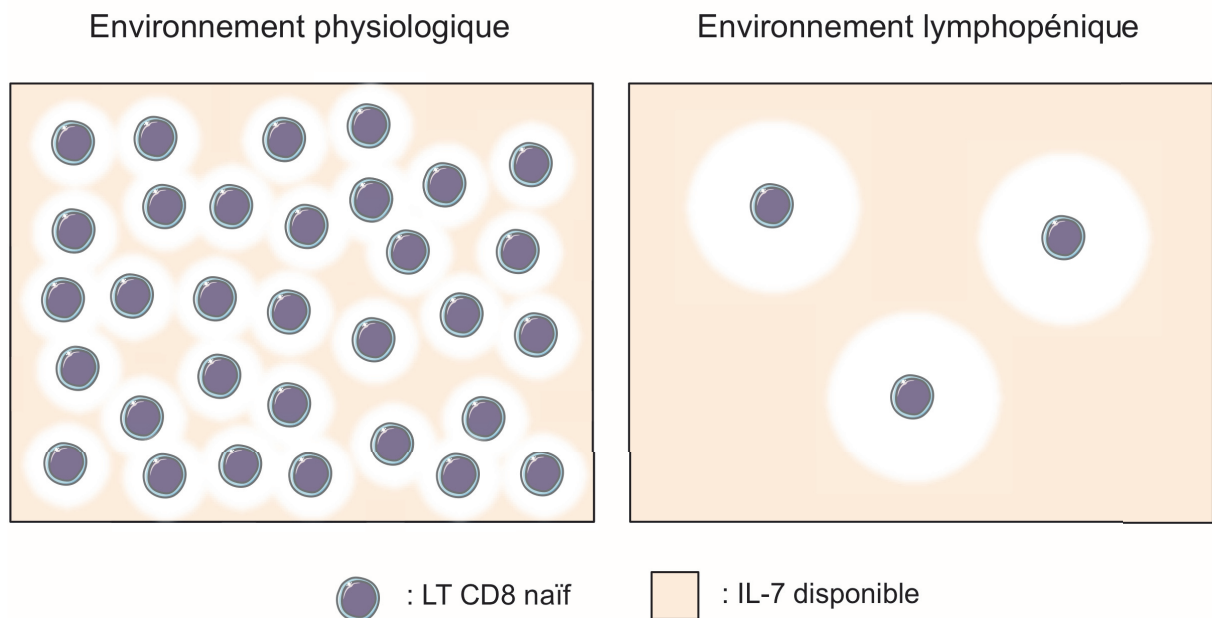
## **A. LT CD8 mémoires innés générés de manière expérimentale**

### **1. Prolifération homéostatique induite par lymphopénie**

La première mise en évidence de ce mode de génération alternatif des LT CD8 mémoires provient d'études testant l'impact des interactions entre le TCR et les complexes CMH/antigène du soi sur la survie des LT naïfs. Pour cela, une approche parmi d'autres consistait à transférer des LT CD8 naïfs dans des souris naïves lymphopéniques (présentant un important déficit en lymphocytes induit par irradiation sublétales ou par manipulations génétiques) WT ou déficientes pour le CMH-I (Tanchot, 1997; Nesić and Vukmanović, 1998). Néanmoins, l'analyse approfondie de ces résultats a permis de mettre en évidence que le maintien des LT CD8 naïfs dans les hôtes lymphopéniques WT est associé à une importante prolifération cellulaire. Ce phénomène, désigné sous le terme de LIP (Lymphopenia-Induced Proliferation), s'accompagne également de l'acquisition par les LT CD8 naïfs transférés du phénotype LT CD8 mémoires conventionnels (CD44<sup>hi</sup>, CXCR3<sup>hi</sup>, CD122<sup>hi</sup>, voir **tableau 1**) (Cho et al., 2000; Ernst, 1999; Goldrath and Bevan, 1999; Kieper and Jameson, 1999; Murali-Krishna and Ahmed, 2000; Goldrath et al., 2004). Il est ici important de noter que cette différenciation des LT CD8 naïfs en LT CD8 de phénotype mémoire a lieu en absence d'antigènes dérivés de pathogène dont ces cellules sont spécifiques. En effet, l'utilisation de transferts adoptifs de LT CD8 naïfs transgéniques pour le TCR dans des souris naïves lymphopéniques permet de contrôler précisément la présence ou l'absence de l'antigène modèle dont sont spécifiques ces LT CD8. Ceci suggère pour la première fois que l'engagement fort du TCR par des antigènes du non soi n'est pas indispensable pour générer des LT CD8 de phénotype mémoire. De plus, cette importante prolifération et cette conversion de phénotype ne sont pas observées lors du transfert de LT CD8 naïfs dans des souris naïves immunocompétentes. Ceci suggère que ces phénomènes dépendent de certains facteurs dont l'expression est modifiée dans les souris naïves lymphopéniques.

#### **a) Le signal cytokinique**

En conditions homéostatiques, les cytokines constituent généralement des ressources limitantes pour lesquelles les LT CD8 entrent en compétition afin de garantir leur survie.



**Figure 11 : Disponibilité augmentée en IL-7 dans un environnement lymphopénique.**

Dans un environnement physiologique, la production constante d'IL-7 fait de cette cytokine une ressource limitante, pour laquelle les nombreux LT CD8 naïfs présent entrent en compétition. La disponibilité en IL-7 est matérialisée par la couleur orange et les halos blancs autour des cellules représente l'IL-7 utilisée par chacune d'entre elles.

Dans un environnement lymphopénique, les quelques LT CD8 naïfs présents ont proportionnellement accès à une quantité plus importante d'IL-7 (représenté par des halos blancs plus grands).

Cette notion est particulièrement vraie pour l'IL-7 qui, comme nous l'avons vu précédemment, est produite de manière constante par les cellules stromales des OLS. Ainsi, en diminuant de manière drastique le nombre de lymphocytes présents dans l'environnement, l'induction de la lymphopénie a pour effet d'augmenter considérablement la disponibilité de l'IL-7 pour les quelques LT CD8 naïfs introduits dans cet environnement. Il en résulte un signal IL-7 plus intense et plus durable reçu par les LT CD8 naïfs, permettant d'induire la prolifération de ces cellules (**Figure 11**). En effet, le transfert de LT CD8 naïfs OTI dans des souris lymphopéniques déficientes pour la production d'IL-7 ou injectées avec un anticorps neutralisant anti-CD127 abroge considérablement la prolifération des cellules transférées (Tan et al., 2001; Goldrath et al., 2002). A l'inverse, l'augmentation de la biodisponibilité de cette cytokine dans des souris immunocompétentes via l'injection d'IL-7 couplée à un anticorps anti-IL-7 permet d'induire une forte prolifération des LT CD8 naïfs malgré l'absence de lymphopénie (Boyman et al., 2008). Ainsi, plus que « l'espace » libéré, c'est l'augmentation de la disponibilité de l'IL-7 induit par la lymphopénie qui permet cette importante prolifération cellulaire et la différenciation en cellules mémoires.

L'IL-15 semble également jouer un rôle important dans le processus LIP, malgré que ce dernier soit controversé. En effet, l'absence d'IL-15 dans l'environnement lymphopénique n'a pas d'impact sur l'initiation de la prolifération des LT CD8 naïfs (Goldrath et al., 2002; Tan et al., 2001). Néanmoins, l'analyse de la prolifération cellulaire dans ces études a lieu très précocement, entre 7 et 9 jours après transfert. A l'inverse, Sandau et collègues analysent beaucoup plus tardivement (entre 5 et 27 jours après transfert) la prolifération de LT CD8 naïfs OTI transférés dans des souris lymphopéniques WT ou déficientes pour l'IL-15. Ils observent que si l'absence d'IL-15 n'a effectivement pas d'impact sur l'initiation de la prolifération homéostatique, cette cytokine est essentielle pour maintenir cette prolifération à des temps plus tardifs (Sandau et al., 2007). Cette dépendance progressive à l'IL-15 s'explique par le fait que la modification du phénotype des LT CD8 naïfs en LT CD8 mémoires est acquise progressivement au fur et à mesure des divisions cellulaires (Cho et al., 2000). Ainsi, en se divisant, les cellules acquièrent l'expression de marqueurs de LT CD8 mémoires, et notamment la chaîne  $\beta$  du récepteur à l'IL-15 (CD122), conférant ainsi à ces cellules une sensibilité envers cette cytokine pour maintenir leur prolifération homéostatique et leur survie (Murali-Krishna and Ahmed, 2000; Goldrath et al., 2002). Cette notion est d'ailleurs supportée par l'étude de Li et collègues. Ils démontrent en effet que lors du processus de prolifération homéostatique induit par lymphopénie, l'IL-7 induit l'activation de la kinase mTOR dans les LT CD8 naïfs, permettant d'exprimer le facteur de transcription Tbet. L'expression de Tbet permet alors l'expression de CD122, rendant ainsi ces cellules

sensibles à l'IL-15 (Li et al., 2011). En absence d'IL-15, la prolifération homéostatique induite par lymphopénie est abortive et conduit à la génération d'un nombre beaucoup plus faible de LT CD8 mémoires innés.

## b) Le signal TCR

Comme nous l'avons vu précédemment, la génération de LT CD8 mémoires innés par LIP est indépendante de l'engagement fort du TCR via la reconnaissance d'antigènes dérivés de pathogènes. Néanmoins, la génération de ces cellules nécessite l'acquisition d'un signal TCR faible via la reconnaissance de complexes CMH-I/antigène du soi. En effet, en utilisant un modèle de LT possédant une expression inductible de la kinase Lck, Seddon et collègues démontrent que le signal TCR via cette kinase est nécessaire pour permettre la prolifération des LT CD8 naïfs dans un environnement lymphopénique et l'acquisition d'un phénotype mémoire (Seddon et al., 2000). De même, le transfert de LT CD8 naïfs dans des souris lymphopéniques déficientes pour le CMH-I, pour le transporteur TAP qui permet l'expression du CMH-I à la surface cellulaire, ou présentant un mismatch au niveau de l'haplotype de CMH-I (H-2k au lieu de H-2b) conduit à l'absence de prolifération de ces cellules (Goldrath and Bevan, 1999; Kieper and Jameson, 1999; Cho et al., 2000; Murali-Krishna and Ahmed, 2000).

Il existe cependant une hiérarchie au sein des signaux TCR faibles. En d'autres termes, l'engagement du TCR par des complexes CMH-I/antigène du soi ne conduit pas à la réception d'un signal TCR de force équivalente dans tous les LT CD8 naïfs. La population de LT CD8 naïfs présente une expression hétérogène de la molécule CD5 ( $CD5^{lo}$  et  $CD5^{hi}$ ). Cette hétérogénéité d'expression de CD5 est également retrouvée entre différentes lignées de LT CD8 transgéniques pour le TCR (Fulton et al., 2015; Kieper et al., 2004). La molécule CD5 est connue pour réguler négativement le signal TCR et permettrait ainsi de prévenir les risques de développement de pathologies auto-immunes via l'induction de tolérance au soi périphérique (Tarakhovsky et al., 1995). En utilisant un modèle de souris rapporteur pour l'expression du gène Nur77 (gène exprimé immédiatement après réception d'un signal TCR), Fulton et collègues démontrent que la stimulation du TCR par des complexes CMH-I/antigène du soi délivre un signal TCR plus important dans les LT CD8 naïfs  $CD5^{hi}$  comparé aux LT CD8 naïfs  $CD5^{lo}$  (Fulton et al., 2015). Il est par ailleurs très intéressant de noter que des LT CD8 naïfs  $CD5^{hi}$  prolifèrent et se différencient en LT CD8 mémoires innés en conditions lymphopéniques beaucoup plus efficacement que des LT CD8 naïfs  $CD5^{lo}$  (Kieper et al.,



2004; Palmer et al., 2011). Ainsi, ces études suggèrent que dans un contexte lymphopénique les LT CD8 naïfs CD5<sup>hi</sup> posséderaient un avantage sélectif en recevant, via la reconnaissance de complexes CMH-I/antigène du soi, un signal TCR suffisamment fort permettant leur prolifération et leur différenciation en LT CD8 mémoires innés.

Le fait que des LT CD8 naïfs CD5<sup>hi</sup> possèdent une plus grande capacité de prolifération et de différenciation en cellules mémoires dans un environnement lymphopénique peut également s'expliquer par une plus grande sensibilité aux cytokines de ces cellules. Cho et collègues démontrent que les LT CD8 naïfs CD5<sup>hi</sup> présentent une réactivité augmentée vis à vis de différentes cytokines, notamment l'IL-2, l'IL-7 et l'IL-15, comparé aux LT CD8 naïfs CD5<sup>lo</sup>. Cette réactivité augmentée dépend de la présence d'un plus grand nombre de radeaux lipidiques à la surface des LT CD8 naïfs CD5<sup>hi</sup>, augmentant la signalisation via les récepteurs de cytokines (Cho et al., 2010). L'étude de Palmer et collègues conduit à la même conclusion. En effet, ils démontrent que les LT CD8 naïfs CD5<sup>hi</sup> possèdent une plus grande sensibilité à l'IL-7, notamment de part l'expression d'un niveau plus important de la chaîne  $\alpha$  du récepteur de cette cytokine (Palmer et al., 2011). Ainsi, le signal TCR augmenté ainsi que la plus grande sensibilité aux signaux cytokiniques des LT CD8 naïfs CD5<sup>hi</sup> semblent conjointement favoriser leur prolifération et leur différenciation en LT CD8 de phénotype mémoire dans un environnement lymphopénique.

La qualité du signal TCR reçu par la reconnaissance de complexes CMH-I/antigène du soi dans un contexte lymphopénique diffère également de celle provenant de la reconnaissance par le TCR de complexes CMH-I/antigène du non soi. Teixeira et collègues démontrent que des LT CD8 OTI présentant une mutation ponctuelle dans le domaine transmembranaire de la chaîne  $\beta$  du TCR sont incapables de générer des LT CD8 mémoires conventionnels dans un contexte d'infection par Lm exprimant l'antigène OVA. Ce défaut est lié à un déficit d'activation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B via le signal TCR (Teixeira et al., 2009). En revanche dans un environnement lymphopénique, ces mêmes LT CD8 naïfs OTI mutants prolifèrent et se différencient en LT CD8 de phénotype mémoire aussi efficacement que des cellules WT (Knudson et al., 2013). Ceci suggère que dans un contexte lymphopénique, l'activation forte de la voie NF- $\kappa$ B via le TCR n'est pas nécessaire pour générer des LT CD8 mémoires innés.

Pour résumé, la réception d'un signal TCR est également importante pour la génération de LT CD8 mémoires innés par LIP. Néanmoins, la quantité et la qualité de ce signal TCR diffère de celles nécessaires pour la génération de LT CD8 mémoires conventionnels. Le mécanisme de génération dans un environnement lymphopénique de LT CD8 mémoires innés est donc supporté par l'intégration de deux types de signaux :



Gènes mutés	Population PLZF <sup>+</sup>	CD8 SP Eomes <sup>+</sup> CD44 <sup>hi</sup>	Effet extrinsèque lié à l'IL-4	Références
ITK <sup>-/-</sup>	↗ γδNKT	↗	oui	(Weinreich et al., 2010; Atherly et al., 2006; Broussard et al., 2006; Hu et al., 2007; Felices, 2009; Yin et al., 2013; Prince et al., 2014)
SLP76 <sup>(Y145F)</sup>	↗ γδNKT	↗	oui	(Jordan et al., 2008; Alonzo et al., 2010; Gordon et al., 2011)
ID3 <sup>-/-</sup>	↗ γδNKT et iNKT2	↗	oui	(Alonzo et al., 2010; D'Cruz et al., 2014; Lauritsen et al., 2009; Verykokakis et al., 2010b; a; Ueda-Hayakawa et al., 2009)
KLF2 <sup>fl/fl</sup> xCD4 <sup>CRE</sup>	↗ iNKT2	↗	oui	(Weinreich et al., 2009; 2010; Lee et al., 2013b)
CBP <sup>fl/fl</sup> xLCK <sup>CRE</sup>	ND	↗	oui	(Weinreich et al., 2010; Fukuyama et al., 2009)
Jm <sup>fl/fl</sup> xCD4 <sup>CRE</sup>	↗ iNKT	↗	oui	(Pereira et al., 2014)
CIITA <sup>Tg</sup>	↗ LT CD4	↗	oui	(Min et al., 2011)
pLCK-β-cat <sup>Tg</sup>	↗ iNKT	↗	oui	(Sharma et al., 2012)
Ly9 <sup>-/-</sup>	↗ iNKT	↗	oui	(Sintes et al., 2013)
Tbx21 <sup>-/-</sup>	↗ iNKT2	↗	oui	(Lee et al., 2013b)
KLF13 <sup>-/-</sup>	↘ iNKT	↘	oui	(Lai et al., 2011)

**Tableau 6 : Lignées murines mutantes caractérisées pour la présence de LT CD8 mémoires innés.**

Tableau présentant une liste non exhaustive des principales lignées murines mutantes dont la caractérisation a révélée une proportion anormale de thymocytes SP possédant un phénotype mémoire (CD8 SP Eomes<sup>+</sup> CD44<sup>hi</sup>). Pour chacune des lignées présentées, l'effet de la mutation sur les LT CD8 est extrinsèque et dépend d'une surreprésentation d'une population cellulaire exprimant le facteur de transcription PLZF. L'IL-4 produit par ces cellules agit sur les thymocytes SP, induisant leur différenciation en cellules mémoires.

↗ : augmentation, ↘ : diminution, ND : non déterminé.

- Un signal cytokinique soutenue délivré par principalement par l'IL-7 (et amplifié par l'IL-15) via l'augmentation de sa biodisponibilité dans l'environnement lymphopénique.
- Un signal TCR faible, délivré via la reconnaissance de complexes CMH-I/antigène du soi.

Ceci contraste fortement avec les signaux nécessaires à la génération de LT CD8 mémoires conventionnels, notamment l'engagement fort du TCR par des complexes CMH-I/antigène du non soi. Dans la prochaine partie, nous allons voir que l'effet d'une stimulation cytokinique soutenue sur la génération de LT CD8 de mémoires innés n'est pas limité à l'IL-7 et s'applique également à d'autres cytokines de la famille  $\gamma$ c.

## 2. Augmentation de la disponibilité en cytokines $\gamma$ c

### a) IL-4

La caractérisation de très nombreuses lignées murines naïves déficientes ou transgéniques pour l'expression de différents gènes a permis de révéler la présence en quantité importante de cellules de phénotype mémoire au sein du pool de thymocytes matures CD8 SP. Ces cellules expriment en effet des marqueurs conventionnels de LT CD8 mémoires induits par antigène, tels que CD44, CXCR3, CD122, ainsi que des facteurs de transcription impliqués dans la différenciation de ces cellules, notamment Eomes (**Tableau 6**) (Lee et al., 2011c). L'interprétation initiale de ces résultats suggérait un rôle intrinsèque des différents gènes mutés dans la régulation de la différenciation en LT CD8 mémoires. Néanmoins, la réalisation de chimères inégales de moelle osseuse de souris WT et KO a finalement permis de conclure à un effet extrinsèque de ces différentes mutations. En effet, dans une souris hôte irradiée et reconstituée avec 80% de moelle déficiente pour l'un des gènes présenté dans le tableau 6, les thymocytes CD8 SP WT acquièrent un phénotype de LT CD8 mémoires (CD44<sup>hi</sup>, Eomes<sup>hi</sup>, CD122<sup>hi</sup>). A l'inverse, la même chimère de moelle osseuse réalisée uniquement avec de la moelle WT conduit à la génération de thymocytes CD8 SP WT possédant un phénotype naïf (CD44<sup>lo</sup>, Eomes<sup>lo</sup>, CD122<sup>lo</sup>) (Weinreich et al., 2010; 2009; Gordon et al., 2011; Verykokakis et al., 2010a; Lee et al., 2013b; Pereira et al., 2014). Il est malgré tout important de noter que certains facteurs semblent influencer négativement de

manière intrinsèque le développement des LT CD8 mémoires innés. Ainsi, une inactivation des gènes codant pour les facteurs de transcription Bcl11b et NF- $\kappa$ B1 conduit à une augmentation de la génération de LT CD8 mémoires innés au niveau du thymus. Néanmoins, les mécanismes impliqués dans la régulation de la génération des LT CD8 mémoires innés par ces facteurs de transcription ne sont pas identifiés (Hirose et al., 2015; Gugasyan et al., 2012).

L'effet extrinsèque commun de ces différentes mutations sur la génération de LT CD8 de phénotype mémoires repose sur une sur-représentation au niveau du thymus d'une population de cellules exprimant le facteur de transcription PLZF (Promyelocytic Leukemia Zinc Finger). Dans le contexte de ces lignées murines mutées, cette population de cellules PLZF<sup>+</sup> sur-représentée est composée de NKT (Natural Killer T cells) possédant un TCR formé d'une chaîne  $\gamma$  et d'une chaîne  $\delta$  (NKT  $\gamma\delta$ ), de NKT invariants de type 2 (iNKT2) possédant un TCR formé d'une chaîne  $\alpha$  invariante (Ja14V $\alpha$ 18) et d'une chaîne  $\beta$ , et de LT CD4. Ces cellules PLZF<sup>+</sup> sont peu différenciées et présentent la particularité de produire abondamment la cytokine IL-4, une caractéristique directement dépendante de l'expression de PLZF (Yin et al., 2013; D'Cruz et al., 2014). Ainsi, dans les différentes lignées murines mutantes caractérisées, la sur-représentation de ces populations cellulaires PLZF<sup>+</sup> associée à leur état de différenciation moins avancé conduit à la création d'un environnement thymique riche en IL-4 (Gordon et al., 2011; Lai et al., 2011; Lee et al., 2013b; Sintès et al., 2013; Prince et al., 2014; Alonzo et al., 2010; Min et al., 2011; Felices, 2009). De manière intéressante, la génération de LT CD8 mémoires innés dans les différentes lignées murines mutantes est abolie lorsque les thymocytes CD8 SP n'expriment pas la chaîne  $\alpha$  du récepteur à l'IL-4 (CD124) (Prince et al., 2014). Ceci confirme que l'IL-4 produit par les cellules PLZF<sup>+</sup> induit un signal dans les thymocytes CD8 SP conduisant à leur différenciation en LT CD8 de phénotype mémoire.

Le signal délivré par la cytokine IL-4 est suffisant pour induire l'expression d'Eomes via l'activation du facteur de transcription STAT6 et la phosphorylation de la kinase AKT, permettant ainsi l'acquisition d'un programme de différenciation en LT CD8 mémoires (Carty et al., 2014; Min et al., 2011; Sharma et al., 2012). Le déficit d'Eomes dans des souris présentant une inactivation pour le gène SLP76 (SLP76 (Y145F) *eomes*<sup>-/-</sup>) conduit à l'absence de génération des LT CD8 mémoires innés normalement observée dans les souris SLP76 (Y145F) (Gordon et al., 2011). De même, des thymocytes CD8 SP KLF2<sup>+/+</sup> *eomes*<sup>-/-</sup> ne se différencient pas en cellules mémoires dans un environnement KLF2<sup>-/-</sup> (Weinreich et al., 2009). Ainsi, l'induction de l'expression d'Eomes par le signal IL-4 est cruciale pour générer des LT CD8 de phénotype mémoire en absence de stimulation antigénique exogène.

## b) IL-2

L'IL-2 est également une cytokine de la famille  $\gamma c$  capable d'induire la génération de LT CD8 de phénotype mémoire. Boyman et collègues démontrent que l'injection *in vivo* d'IL-2 associée à un anticorps anti-IL-2 a pour effet d'augmenter la biodisponibilité de cette cytokine et ainsi d'induire la prolifération des LT CD8 naïfs et mémoires (Boyman et al., 2006). En transférant au préalable des LT CD8 naïfs OTI dans des souris immunocompétentes, Kamimura et collègues démontrent que ces injections de complexes IL-2/anticorps anti-IL-2 permettent également la différenciation en LT CD8 OTI de phénotype mémoire malgré l'absence de l'antigène modèle OVA dans ce système (Kamimura and Bevan, 2007). Cho et collègues démontrent que le signal induit par l'IL-2 dans des LT CD8 naïfs est suffisant pour induire l'expression de facteurs de transcription clés pour la différenciation en cellules mémoires, notamment Eomes, ainsi que l'acquisition de fonction effectrices associées à ces cellules (Cho et al., 2013). Ainsi, ces études démontrent qu'une forte stimulation de LT CD8 naïfs par l'IL-2 est suffisante pour induire leur différenciation en LT CD8 de phénotype mémoire, indépendamment de l'engagement fort du TCR par des complexes CMH-I/antigène du non soi.

Cette seconde série d'études démontre qu'une stimulation forte par d'autres cytokines  $\gamma c$ , notamment l'IL-4 et l'IL-2, permet également la génération de LT CD8 mémoires malgré l'absence d'un signal TCR fort délivré via la reconnaissance de complexes CMH-I/antigène du non soi. Le rôle d'un signal TCR faible dans la génération de ces cellules mémoires innées induites par IL-4 et IL-2 n'a pas été déterminé. Contrairement aux LT CD8 mémoires innés induit par LIP, ces cellules sont générées dans des hôtes immunocompétents. Nous allons à présent voir que des LT CD8 mémoires innés sont générés dans des conditions physiologiques. La génération de ces cellules semble dépendre d'une combinaison des différents mécanismes que nous venons de décrire.

## **B. Génération physiologique de LT CD8 mémoires innés**

Le pool de LT CD8 retrouvé dans les OLS de souris naïves maintenues en condition d'hébergement SPF (Specific Pathogen Free) contient environ 20% de cellules possédant un phénotype mémoire ( $CD44^{hi}$ ,  $CD122^{hi}$ ,  $CXCR3^{hi}$ ). Ces cellules sont générées malgré l'absence apparente d'infection par un agent pathogène, suggérant qu'elles correspondent à des LT CD8 mémoires innés.

## 1. Stimulations fortes par des cytokines yc.

Une grande partie des cellules mémoires retrouvées dans des souris naïves SPF est générée durant la période néonatale, soit entre 1 et 4 semaines après la naissance (Akue et al., 2012). Durant cette période, le système immunitaire périphérique encore immature va progressivement être formé par l'émigration des LT naïfs depuis le thymus et des LB naïfs depuis la moelle osseuse. Ainsi, la période néonatale constitue un épisode de lymphopénie naturelle, conférant ainsi un environnement favorable à la génération de LT CD8 mémoires innés. Le Campion et collègues démontrent d'ailleurs que les LT CD8 naïfs périphériques de souriceaux (âgés de 2 à 10 jours) prolifèrent de manière très importante et acquièrent l'expression du marqueur mémoire CD44 *in vivo*. Cette intense prolifération est dépendante d'un signal TCR faible, via la reconnaissance de complexes CMH-I/antigène du soi, et de la quantité de cellules présentant à la périphérie (Le Campion et al., 2002). De même, Schüler et collègues démontrent que le transfert de LT CD8 naïfs dans des souriceaux âgés de 1 à 4 jours conduit à une importante prolifération de ces cellules et à l'acquisition d'un phénotype mémoire de manière dépendante du signal IL-7 (Schüler et al., 2004). Ainsi, ces études démontrent que l'épisode lymphopénique transitoire présent dans l'environnement néonatal favorise une stimulation forte des LT CD8 naïfs par l'IL-7, conduisant à la génération de LT CD8 mémoires innés dans des souris naïves.

L'IL-4 est également impliquée dans la génération physiologique des LT CD8 mémoires innés. Par exemple, les souris naïves BALB/c possèdent un nombre très important de LT CD8 de phénotype mémoire au niveau du thymus tandis que les souris naïves C57BL/6 en possèdent très peu. Ce phénomène est directement lié à la sur-représentation naturelle dans les souris BALB/c de cellules NKT2 exprimant le facteur de transcription PLZF et produisant de l'IL-4 (Lee et al., 2013b; Weinreich et al., 2010). Les cellules NKT2 ne semblent néanmoins pas être l'unique source d'IL-4 permettant de générer naturellement des LT CD8 mémoires innés. En effet, malgré la très faible proportion de cellules NKT2 dans les souris C57BL/6, l'ablation du signal IL-4 dans ces souris (CD124<sup>-/-</sup>) conduit à une diminution de la population périphérique de LT CD8 de phénotype mémoire (Akue et al., 2012). A l'inverse, l'étude de Kurzweil et collègues démontre que l'augmentation de la production d'IL-4 par les LT CD4 périphériques, via l'inactivation du gène codant pour la protéine Ndfip1, conduit à une augmentation significative du nombre de LT CD8 de phénotype mémoire (Kurzweil et al., 2014). De même, les réponses immunitaires contre des parasites (réponse de type TH2) conduisent à une importante production d'IL-4 par les LT CD4, qui stimule la prolifération

des LT CD8 naïfs et contribue à l'accumulation de LT CD8 de phénotype mémoire (Morris et al., 2009).

Le signal IL-15 est également crucial pour la population de LT CD8 mémoires innés présente dans des animaux naïfs. En effet, des souris naïves déficientes pour le signal IL-15 ou pour la production de cette cytokine présentent une très faible proportion de LT CD8 de phénotype mémoire comparé à des animaux WT (Sosinowski et al., 2013; Schüler et al., 2004). Sosinowski et collègues démontrent que c'est la trans-présentation de l'IL-15 par les DC CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> résidentes des ganglions lymphatiques qui favoriserait la génération de ces cellules de phénotype mémoire (Sosinowski et al., 2013). Néanmoins, ces résultats sont à nuancer. En effet, s'il est indéniable que l'IL-15 a un impact sur la population de LT CD8 de phénotype mémoire présente dans des animaux naïfs, il est particulièrement difficile d'interpréter si cette cytokine joue un rôle dans la génération de ces cellules ou dans leur maintien. En effet, comme nous l'avons vu précédemment, l'IL-15 est une cytokine essentielle au maintien à long terme des LT CD8 mémoires. Ainsi, l'IL-15 semble être importante pour le maintien des LT CD8 mémoires innés dans des animaux naïfs, même si un rôle de cette cytokine dans la génération de ces cellules n'est pas à exclure.

Enfin, une autre cytokine n'appartenant pas à la famille  $\gamma$ c favorise la génération de LT CD8 mémoires innés dans des animaux naïfs. En effet, une étude très récente de Martinet et collègues démontre que cette population de cellules est considérablement réduite dans des souris naïves déficientes pour le récepteur à l'IFN-I. A l'inverse, l'injection de Poly I/C (connue pour induire la production d'IFN-I) dans des souris naïves permet la génération d'un plus grand nombre de LT CD8 de phénotype mémoire. L'IFN de type I induit directement l'expression d'Eomes, via STAT1 et IRF9 (Martinet et al., 2015). Cette étude constitue la première démonstration qu'une cytokine n'appartenant pas à la famille  $\gamma$ c peut induire la génération de LT CD8 de phénotype mémoire dans des animaux naïfs.

## 2. Absence de signal TCR fort

La nécessité de l'intégration d'un signal TCR fort pour la génération des LT CD8 de phénotype mémoire retrouvés naturellement dans des souris naïves est une question particulièrement complexe, étant donné que la spécificité antigénique de ces cellules n'est pas connue. L'étude de Haluszczak et collègues a permis de lever une part d'ombre sur cette spécificité antigénique (Haluszczak et al., 2009). En utilisant des tétramères de CMH-I couplés à des billes et chargés avec différents antigènes connus pour générer des réponses T

CD8 importantes (OVA, HSV-1 ou B8R), ils purifient à partir de souris naïves SPF uniquement les LT CD8 possédant le TCR spécifique de l'antigène d'intérêt. L'analyse du phénotype des LT CD8 purifiés révèle que pour chaque antigène étudié, environ 75% des cellules spécifiques possèdent un phénotype naïf et 25% possèdent un phénotype de cellules mémoires. En utilisant le même protocole, Akue et collègues identifient au sein des LT CD8 de phénotype mémoire des cellules spécifiques de 5 antigènes dérivés du virus MCMV (Mouse CytoMegalovirus) (Akue et al., 2012). Ainsi, la population de LT CD8 de phénotype mémoire retrouvée dans des souris naïves est composée de cellules spécifiques d'antigènes provenant de pathogènes avec lesquels ces animaux n'ont jamais été en contact (Haluszczak et al., 2009). Ces cellules ne possèdent par ailleurs pas de deuxième TCR avec une spécificité antigénique différente pouvant expliquer une génération via la reconnaissance d'un second antigène du non soi (Akue et al., 2012). Ces LT CD8 de phénotype mémoire spécifiques d'antigènes dérivés de pathogènes sont retrouvés en nombre équivalent dans des souris naïves Germ free (animaux dépourvus de flore commensale), indiquant que les antigènes dérivés de la flore commensale ne sont pas impliqués dans la génération de ces cellules dans ce contexte (Haluszczak et al., 2009). Plus marquant encore, le développement de ces LT CD8 mémoires innés dans des souris naïves antigen free (souris germ free recevant uniquement des nutriments chimiques ultrafiltrés pour éliminer les antigènes provenant de la nourriture) indique que ces LT CD8 mémoires semblent être générés via un mécanisme indépendant de la reconnaissance d'antigène du non soi, même si ces observations préliminaires ne sont pour le moment pas publiées (Jameson et al., 2015).

En conclusion, ces études démontrent qu'au moins une partie des LT CD8 de phénotype mémoire retrouvés dans des souris naïves sont générés indépendamment de l'engagement fort de leur TCR via de la reconnaissance de l'antigène dérivé de pathogène dont il est spécifique. Associé à la dépendance de fortes stimulations cytokiniques pour la génération de ces cellules, l'ensemble de ces données démontre clairement qu'au moins une partie des LT CD8 de phénotype mémoires retrouvés dans des animaux naïfs sont des LT CD8 mémoires innés.

## **C. Caractéristiques des LT CD8 mémoires innés**

### **1. Phénotype**

Marqueurs phénotypiques	LT CD8 naïfs	LT CD8 mémoires	
		Conventionnels	Innés
CD44	lo	hi	hi
CXCR3	lo	hi	hi
CD122	lo	hi	hi
Ly6C	lo	hi	hi
LFA1	+	++	++
CD62L	+	+/-	+
CD127	hi	hi	hi

**Tableau 7 : Phénotype identique des LT CD8 mémoires conventionnels et innés.**

Tableau présentant l'expression des marqueurs mémoires classiques par les LT CD8 naïfs, les LT CD8 mémoires conventionnels et les LT CD8 mémoires innés. Pour un certain nombre de ces marqueurs, c'est le niveau d'expression (lo : faible, hi : forte) qui permet de distinguer les populations de LT CD8.

- : absence d'expression, + : expression.



Comme nous l'avons vu précédemment, on distingue aisément les LT CD8 naïfs des LT CD8 mémoires conventionnels par l'expression différentielle de plusieurs marqueurs phénotypiques classiques, appelés marqueurs mémoires (**Tableau 1**). Ces marqueurs phénotypiques sont exprimés de manière similaire par les LT CD8 mémoires innés (**Tableau 7**) (Goldrath et al., 2000; Cho et al., 2000; Murali-Krishna and Ahmed, 2000). Ainsi, basé sur l'expression des marqueurs mémoires classiques, les LT CD8 mémoires conventionnels et innés présentent un phénotype identique. Dès lors, dans un contexte physiologique, où LT CD8 mémoires conventionnels et innés co-existent, la distinction entre ces deux classes de cellules mémoires est impossible.

La chaîne  $\alpha$  de l'intégrine VLA4 (CD49d) semble constituer un marqueur phénotypique différentiellement exprimé entre LT CD8 mémoires conventionnels et innés. En effet, CD49d est exprimé par des LT CD8 mémoires OTI générés en réponse à une infection par Lm portant l'antigène OVA tandis qu'il n'est pas exprimé par des LT CD8 mémoires OTI générés par LIP (Haluszczak et al., 2009). De plus dans des souris naïves, les LT CD8 mémoires innés spécifiques de l'antigène B8R n'expriment pas CD49d (Haluszczak et al., 2009). Néanmoins, aucune étude à ce jour ne démontre clairement que dans un contexte physiologique (non transgénique pour le TCR) l'expression de CD49d permet de distinguer les LT CD8 mémoires innés des LT CD8 mémoires conventionnels.

## 2. Fonction

Les propriétés des LT CD8 mémoires innés générés physiologiquement sont relativement peu connues. Ainsi, l'essentiel de la caractérisation fonctionnelle de ces cellules a été réalisé à l'aide de modèles de génération expérimentaux (LIP, stimulations fortes par des cytokines  $\gamma c$ ) utilisant des LT CD8 transgéniques pour le TCR.

### a) LT CD8 mémoires innés générés expérimentalement

Une étude du transcriptome de LT CD8 mémoires OTI générés par LIP démontre que le programme génétique de ces cellules est très proche de celui des LT CD8 mémoires OTI générés en réponse à une infection par Lm portant l'antigène OVA (Goldrath et al., 2004). Les LT CD8 mémoires innés générés expérimentalement expriment notamment certains

facteurs de transcription clés pour la différenciation en LT CD8 mémoires (Eomes et Tbet). Néanmoins, comparé à leurs homologues conventionnels, ces cellules expriment de plus fort niveau d'Eomes et de plus faible niveau de T-bet (Weinreich et al., 2009; 2010). Cette expression plus importante d'Eomes est le reflet de la génération de ces cellules mémoires par de fortes stimulations cytokiniques.

Contrairement aux LT CD8 naïfs, les LT CD8 mémoires innés générés expérimentalement par LIP ou par stimulation cytokiniques fortes sont capables de ré-acquérir très rapidement l'expression de fonctions effectrices (production d'IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  et de granzyme B) après engagement fort de leur TCR. De même, ces cellules sont capables de lyser rapidement des cellules cibles portant l'antigène dont elles sont spécifiques (Hamilton et al., 2006; Murali-Krishna and Ahmed, 2000; Fukuyama et al., 2009). Ces cellules possèdent également une réactivité augmentée vis à vis de l'IL-12 et l'IL-18 conduisant à la production rapide d'IFN- $\gamma$  (Hamilton et al., 2006; Hu et al., 2007). Enfin, le transfert dans des souris naïves de LT CD8 mémoires OTI induits par LIP, suivi d'une infection par la bactérie Lm exprimant l'antigène OVA, conduit à l'élimination rapide de cette bactérie (Hamilton et al., 2006). De même, le transfert de LT CD8 mémoires innés, provenant de souris déficientes pour la kinase ITK, dans des souris IFN $\gamma$ -/- permet de restaurer la capacité de ces souris à éliminer une infection par la bactérie Lm (Hu et al., 2007).

Certaines différences semblent néanmoins exister entre les LT CD8 mémoires conventionnels et ceux induits par LIP. En utilisant un modèle de co-transfert suivi d'une infection par la bactérie Lm exprimant l'antigène OVA, Cheung et collègues démontrent les LT CD8 mémoires OTI induits par LIP prolifèrent moins, contractent plus rapidement et contribuent moins au pool de LT CD8 mémoires secondaires que leur homologues conventionnels. Cette différence corrèle avec une localisation différente de ces deux populations de LT CD8 mémoires au sein de la rate (Cheung et al., 2009).

#### b) LT CD8 mémoires innés générés physiologiquement

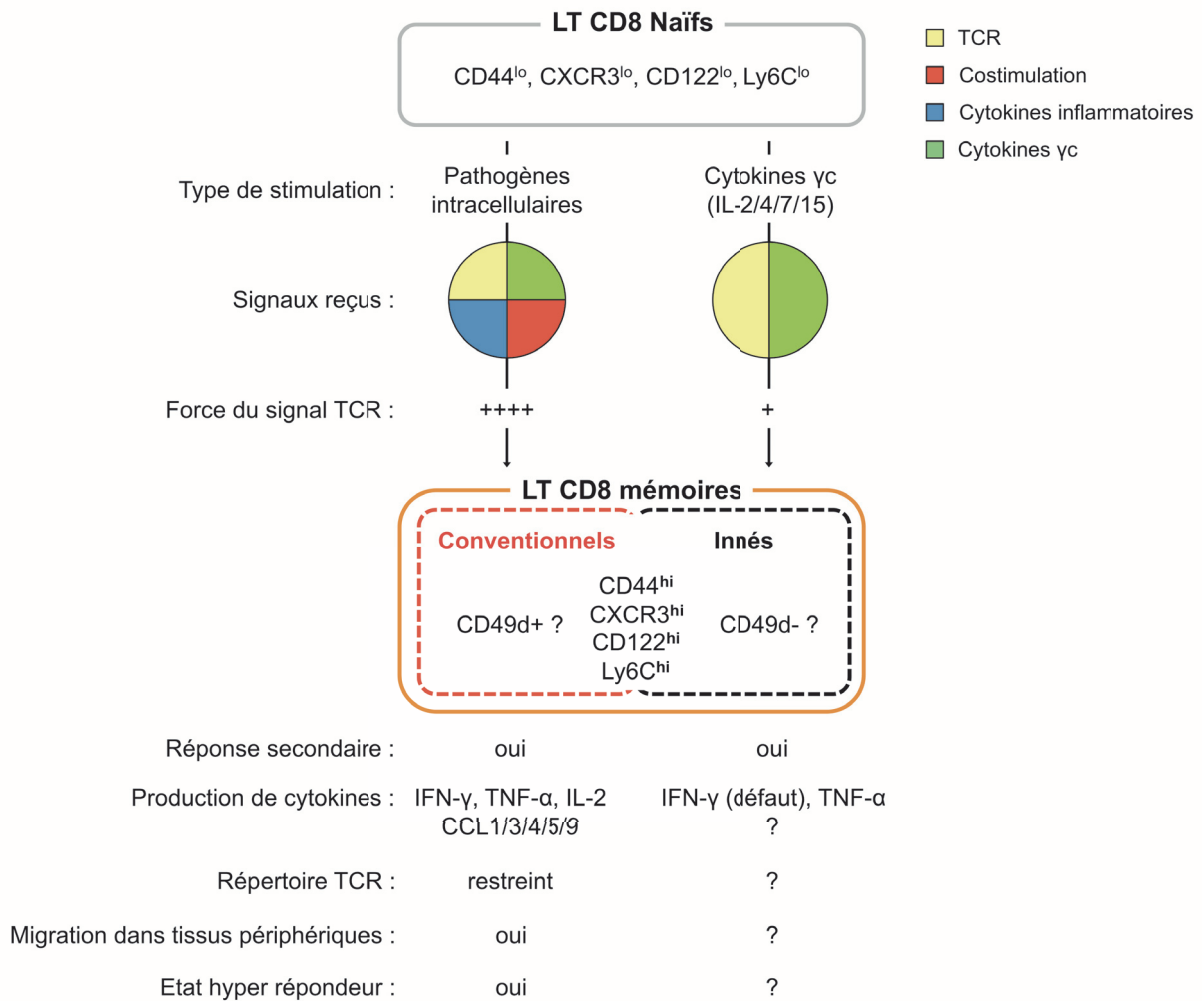
La caractérisation fonctionnelle de la population de LT CD8 mémoires innés générés physiologiquement est particulièrement complexe. En effet, comme nous l'avons vu précédemment, la majorité des spécificités antigéniques de cette population demeurent inconnues. De plus, pour les spécificités antigéniques connues, la fréquence de cellules spécifiques de cet antigène est très faible (par exemple environ 200 cellules spécifiques de l'antigène B8R) (Haluszcak et al., 2009). Lee et collègues ont développé un modèle de

souris transgéniques pour la chaîne  $\beta$  du TCR OTI. Les réarrangements VJ permettant la génération de différentes chaîne  $\alpha$  associées à cette chaîne  $\beta$  favorise la génération d'une population de LT CD8 polyclonale dans ces souris. Néanmoins, l'expression forcée d'une chaîne  $\beta$  unique favorise un enrichissement de cette population en cellules exprimant un TCR spécifique de l'antigène OVA (1 à 2% des LT CD8). Ainsi, les LT CD8 mémoires innés retrouvés au sein de ces souris naïves sont également enrichies en cellules spécifiques de OVA (Lee et al., 2013a). Comparé à des LT CD8 mémoires conventionnels, les LT CD8 mémoires innés expriment un plus fort niveau d'Eomes et un plus faible niveau de Tbet. La stimulation antigénique *in vitro* de LT CD8 mémoires innés spécifiques de l'antigène OVA conduit à une production rapide d'IFN- $\gamma$  et de TNF- $\alpha$ . Néanmoins, seulement 20% de ces cellules produisent ces cytokines contre presque 100% des LT CD8 mémoires conventionnels spécifiques de l'antigène OVA (Lee et al., 2013a). Afin de comparer les fonctions des LT CD8 mémoires innés avec celles des LT mémoires conventionnels et des LT CD8 naïfs, Lee et collègues réalisent des expériences de co-transferts suivit d'infections par la bactérie Lm exprimant l'antigène OVA. Par rapport au LT CD8 naïfs, les LT CD8 mémoires innés prolifèrent plus rapidement lors de la phase précoce de la réponse immunitaire. Néanmoins, au pic de la réponse immunitaire, un nombre comparable de LT CD8 effecteurs est généré par ces deux populations. De plus, ces deux populations génèrent un nombre équivalent de LT CD8 mémoires après la phase de contraction (Lee et al., 2013a). La cinétique de réponse des LT CD8 mémoires innés est équivalente à celles des LT CD8 mémoires conventionnels. Cependant, les LT CD8 mémoires innés génèrent plus de MPEC, suggérant que ces deux populations pourraient contribuer différemment à l'établissement du pool de LT CD8 mémoires secondaire (Lee et al., 2013a). Enfin, il est important de noter que le transfert de LT CD8 mémoires innés spécifiques de l'antigène OVA suivi d'une infection par Lm-OVA conduit à une élimination de ce pathogène aussi efficace que celle observé lors du transfert de LT CD8 mémoires conventionnels. De même, l'étude très récente de Lee et collègues démontre que parmi les LT CD8 mémoires innés générés physiologiquement, les cellules dont la génération dépend d'une stimulation forte par l'IL-4 permettent le contrôle d'infections chroniques par le virus LCMV clone 13. En effet, des souris BALB/c déficientes pour la molécule CD1d (conduisant à un déficit de iNKT, principaux producteurs d'IL-4) présentent un défaut d'élimination du virus comparé à des souris BALB/c WT (Lee et al., 2015).

#### **D. LT CD8 mémoires innés chez l'homme**

Compte tenu de la très grande variété d'agents pathogènes auxquels nous sommes continuellement confronté, il est extrêmement complexe de déterminer si une population de LT CD8 mémoires innés existe chez l'homme. L'étude de Su et collègues révèle que le pool de LT CD4 mémoires chez l'homme adulte sain contient des nombreuses cellules spécifiques d'antigènes avec lesquels ces donneurs n'ont jamais été en contact. Par exemple, des LT CD4 mémoires spécifiques du HIV sont retrouvés dans le sang d'individus n'ayant jamais contractés d'infection par ce pathogène. Ces cellules possèdent le phénotype, l'expression de certains gènes, ainsi que les fonctions de LT CD4 mémoires conventionnels. Sun et collègues démontrent néanmoins que certains TCR de ces LT CD4 mémoires (par exemple le TCR spécifique de l'haemagglutinine du virus Influenza H1N1) sont capables de réagir de manière croisée avec des antigènes microbiens. Ils proposent ainsi que ces LT CD4 mémoires seraient générés via des mécanismes de réaction croisée du TCR (Su et al., 2013). Néanmoins, même si ces résultats sont particulièrement convaincants, l'hypothèse que tous les LT CD4 mémoires générés possèdent un TCR capable de réactions croisées avec des antigènes microbiens paraît peu probable. A l'inverse, une génération de ces cellules mémoires via des cytokines pourrait également expliquer ce phénomène.

L'analyse de thymus et de rate de fœtus humains révèle l'existence d'une population de LT CD8 exprimant le facteur de transcription Eomes. Certaines de ces cellules possèdent un phénotype mémoire et produisent rapidement de l'IFN- $\gamma$  après stimulation par la PMA/Ionomycine (Min et al., 2011). L'observation de cette population dans des fœtus humains, relativement protégés des contacts avec des antigènes du non soi, suggère que cette population de cellule pourrait être générées via des mécanismes dépendant de cytokines. Très récemment, Jacomet et collègues ont identifié chez l'homme adulte une population de LT CD8 qui pourrait correspondre à des cellules mémoires innées. Cette population de cellules exprime Eomes ainsi que le récepteur NKG2A et possèdent un phénotype de cellules mémoire terminalement différenciées. Ces cellules produisent rapidement de l'IFN- $\gamma$  après restimulation par PMA/Ionomycine ou par IL-12 /IL-18. De manière intéressante, cette population de cellules est également observée dans des échantillons de sang de cordon humain. De plus, la fraction de ces cellules corrèle directement avec le niveau d'expression du facteur de transcription PLZF dans les cellules CD3<sup>+</sup>, suggérant que ces cellules pourraient être générées via un mécanisme dépendant de l'IL-4 (Jacomet et al., 2015b). L'ensemble de ces observations indique que des LT CD8 mémoires innés semble être également présent chez l'homme, même si le mode de génération de ces cellules n'est pour l'instant pas identifié.



**Figure 12 : La population de LT CD8 de phénotype mémoire comporte deux classes de cellules.**

En fonction des signaux reçus par leur précurseur commun (LT CD8 naïf), deux classes de LT CD8 mémoires sont générées. L'engagement fort du TCR par des antigènes provenant de pathogènes, associé à un signal de costimulation et un signal inflammatoire conduit à la génération de LT CD8 mémoires conventionnels. A l'inverse, la réception d'un signal cytokinique fort (délivré principalement par des cytokines  $\gamma$ c) associé à un signal TCR faible (via la reconnaissance d'antigènes du soi) suffit à générer des LT CD8 mémoires innés. Ces deux populations possèdent un phénotype similaire, rendant extrêmement complexe leur distinction *in vivo*. Par conséquent, la population de LT CD8 mémoires innés générée physiologiquement demeure peu caractérisée.

### **Conclusion III**

Au cours de cette troisième partie, nous avons décrit l'existence d'un mode de génération alternatif de LT CD8 mémoires. L'intégration d'un signal cytokinique fort (essentiellement délivré via des cytokines  $\gamma c$ ) couplé à un signal TCR faible (délivré via la reconnaissance de complexes CMH-I/antigène du soi) suffit en effet à générer des LT CD8 mémoires indépendamment de la reconnaissance d'antigènes dérivés de pathogènes. La génération de ces cellules mémoires ne constitue pas un artéfact expérimental. En effet, ces conditions de stimulation particulières sont identifiées dans des contextes physiologiques, notamment durant la période néonatale, et conduisent à la génération naturelle de LT CD8 mémoires innés. Le phénotype de ces cellules est extrêmement similaire à celui des LT CD8 mémoires conventionnels, rendant presque impossible la distinction de ces deux classes de cellules mémoires *in vivo*. En conséquence, les fonctions de la population de LT CD8 mémoires innés générée physiologiquement sont relativement peu caractérisées. Enfin, ces LT CD8 mémoires innés semblent également être générés chez l'homme.

### **IV. Conclusion générale et présentation du travail de thèse**

Au cours de cette introduction bibliographique, nous avons vu qu'à partir d'un précurseur commun (les LT CD8 naïfs), deux classes de LT CD8 mémoires sont générées. C'est l'intégration de différents signaux par les LT CD8 naïfs qui régule leur différenciation en LT CD8 mémoires conventionnels ou innés. Ainsi, l'intégration d'un signal TCR fort (via la reconnaissance spécifique d'antigènes dérivés de pathogène), couplé à un signal de costimulation et à un signal cytokinique pro-inflammatoire, conduit à la génération de LT CD8 mémoires conventionnels (**Figure 12**). A l'inverse, l'intégration d'un fort signal cytokinique (via la stimulation par des cytokine  $\gamma c$ ), couplé à un faible signal TCR (via la reconnaissance de complexes CMH-I/antigène du soi), conduit à la génération de LT CD8 mémoires innés indépendamment de la reconnaissance de l'antigène dérivé de pathogène dont ces cellules sont spécifiques (**Figure 12**).

Les LT CD8 mémoires innés ont très largement été étudiés depuis une quinzaine d'années, notamment via l'utilisation de modèles de génération expérimentaux utilisant des LT CD8 transgéniques pour le TCR. Ces expériences ont notamment permis de démontrer que des LT CD8 mémoires conventionnels et innés de même spécificité antigénique possèdent des propriétés fonctionnelles comparables, notamment la capacité à contrôler une

infection par un pathogène. Néanmoins, les caractéristiques de la population polyclonale de LT CD8 mémoires innés générée physiologiquement sont relativement mal connues. En effet, seuls Lee et collègues ont étudiés la contribution de ces cellules à une réponse immunitaire vis à vis d'un pathogène exprimant un antigène dont elles sont spécifiques (Lee et al., 2013a). Leur étude confirme que ces cellules se comportent comme de vraies cellules mémoires, dans le sens où elles présentent une réponse accélérée en terme de prolifération et de production de cytokines. Néanmoins, cette étude fait une nouvelle fois appel à une manipulation génétique pour augmenter artificiellement la fréquence de LT CD8 mémoires innés spécifiques d'un antigène donné. Ainsi, la caractérisation de la population de LT CD8 mémoires innés générés en absence complète de manipulation n'a pas été abordée. Cette absence de caractérisation est notamment liée au phénotype extrêmement semblable des LT CD8 mémoires innés avec leurs homologues conventionnels (**Figure 12**). En effet, seule l'intégrine CD49d semble être différenciellement exprimée entre ces deux classes de LT CD8 mémoires. Néanmoins, aucune étude à ce jour ne démontre clairement que dans un contexte physiologique (non transgénique pour le TCR) l'expression de CD49d permet de distinguer les LT CD8 mémoires innés des LT CD8 mémoires conventionnels (**Figure 12**).

De nombreuses questions demeurent ainsi en suspend concernant la population de LT CD8 mémoires innés. En effet, la nature ainsi que la quantité des signaux nécessaires à la génération des LT CD8 mémoires conventionnels et innés diffère (**Figure 12**). Dès lors, on peut supposer que différentes voies de signalisation sont potentiellement activées lors de la génération de l'une ou l'autre de ces populations cellulaires, conduisant à l'induction de programmes de différenciation distincts, influant sur l'expression de gènes et l'acquisition de fonctions effectrices. Ainsi, l'une des questions majeures concernant les LT CD8 mémoires innés générés dans des conditions physiologiques est de savoir si ces cellules sont réellement des cellules mémoires. Possèdent-elles toutes les caractéristiques fonctionnelles améliorées des LT CD8 mémoires conventionnels ou sont elles simplement des LT CD8 naïfs déguisés en LT CD8 mémoires ? De même, est ce que certains gènes sont spécifiquement exprimés par cette population cellulaire comparé aux LT CD8 mémoires conventionnels ? Enfin, le rôle de la population de LT CD8 mémoires innés demeure également inconnu. Il est donc nécessaire, pour répondre à ces différentes questions, de pouvoir comparer ces deux classes de LT CD8 mémoires dans des conditions physiologiques. Cela implique d'identifier des marqueurs différenciellement exprimés entre ces deux populations de cellules.

Comme nous l'avons vu durant cette introduction, les LT CD8 mémoires conventionnels expriment la chimiokine CCL5 et le récepteur NKG2D. Des expériences de microarray réalisées avant mon arrivée au laboratoire démontrent que les gènes *Ccl5* et *Klrl1*



(codant pour NKG2D) sont parmi les gènes les plus différentiellement exprimés entre LT CD8 mémoires conventionnels F5 et LT CD8 naïfs. De manière intéressante, deux étudiants en thèse au sein de notre laboratoire ont montrés que l'IL-4 module l'expression de ces deux protéines dans les LT CD8 mémoires. Antoine Marçais a démontré qu'un traitement par l'IL-4 de LT CD8 mémoires conduit à la diminution de l'expression du gène codant pour la chimiokine CCL5 (Marçais et al., 2006a). Erwan Ventre a démontré plus récemment que l'IL-4 régule négativement l'expression du récepteur NKG2D dans les LT CD8 mémoires conventionnels (Ventre et al., 2012). Compte tenu de l'effet de l'IL-4 sur l'expression de CCL5 et NKG2D et sur la génération des LT CD8 mémoires innés, nous avons émis l'hypothèse que ces deux protéines pourraient être différentiellement exprimées entre les LT CD8 mémoires conventionnelles et innées.

Mon travail de thèse s'est articulé en deux grandes parties. Dans une première partie, j'ai validé l'hypothèse selon laquelle CCL5 et NKG2D sont différentiellement exprimés entre les LT CD8 mémoires conventionnels et innés, rendant ainsi possible la distinction *in vivo* entre ces deux populations de cellules mémoires. Une dichotomie similaire a été observée dans plusieurs lignées murines et également chez l'homme. Dans une seconde partie, j'ai utilisé l'expression différentielle de ces marqueurs pour caractériser de manière approfondie la population polyclonale de LT CD8 mémoires innés générée physiologiquement. Nos résultats démontrent que ces cellules ont une réactivité augmentée comparé à des cellules naïves, mais malgré tout inférieure à celle de LT CD8 mémoires conventionnels. En accord avec cette observation, des expériences de microarray nous ont permis de mettre en évidence que les LT CD8 mémoires innés possèdent un programme génétique très proche de celui des LT CD8 mémoires conventionnels. Néanmoins, ces cellules innées sont moins différenciées que leurs homologues conventionnels. De manière intéressante, nous démontrons que la population de LT CD8 mémoires innés conserve des caractéristiques typiques de cellules naïves, notamment un répertoire TCR diversifié favorisant la participation de ces cellules à des réponses immunitaires primaires contre différents pathogènes. Enfin, nous avons mis en évidence qu'en conditions inflammatoires, ces cellules mémoires innées sont recrutées beaucoup moins efficacement au niveau de tissus périphériques que les LT CD8 mémoires conventionnels.

Ainsi, l'ensemble de ce travail de thèse a conduit dans un premier temps à l'identification d'outils permettant pour la première fois la distinction *in vivo* entre les LT CD8 mémoires conventionnels et innés. Grâce à ces nouveaux outils, ce travail de thèse a permis dans un deuxième temps de démontrer que les LT CD8 mémoires innés constituent une population cellulaire hybride, à la frontière entre LT CD8 naïfs et LT CD8 mémoires

conventionnels. Ces résultats ont donnés lieu à la rédaction d'un article scientifique (soumis à The journal of experimental medicine) ainsi qu'au dépôt d'un brevet concernant l'utilisation de CCL5 comme biomarqueur des LT CD8 mémoires conventionnels

# Résultats

# **Innate memory CD8 T cells share features with naive and antigen-induced memory CD8 T cells.**

Morgan Grau<sup>1, 2, 3, 4, 5</sup>, Julien Mafille<sup>1, 2, 3, 4, 5</sup>, Sophia Djebali<sup>1, 2, 3, 4, 5</sup>, Martine Tomkowiak<sup>1, 2, 3, 4, 5</sup>, Séverine Valsesia<sup>1, 2, 3, 4, 5</sup>, Anne-Laure Mathieu<sup>1, 2, 3, 4, 5</sup>, Simon de Bernard<sup>6</sup>, Pierre-Emmanuel Jouve<sup>6</sup>, Laurent Buffat<sup>6</sup>, Yann Leverrier<sup>1, 2, 3, 4, 5</sup>, Thierry Walzer<sup>1, 2, 3, 4, 5</sup>, Jacqueline Marvel<sup>1, 2, 3, 4, 5</sup>.

1 CIRI, Centre International de Recherche en Infectiologie - International Center for Infectiology Research, Lyon, France.

2 Inserm, U1111, Lyon, France.

3 Ecole Normale Supérieure de Lyon, Lyon, France.

4 Université Lyon 1, Lyon, France.

5 CNRS, UMR5308, Lyon, France

6 Altrabio, Lyon, France

Corresponding author:

Jacqueline Marvel

Centre International de Recherche en Infectiologie (CIRI), INSERM U1111 – CNRS UMR5308, Université Lyon 1, ENS de Lyon. 21 Avenue Tony Garnier - 69365 LYON cedex 07, France. Tel +33437287655. E-mail: [jacqueline.marvel@inserm.fr](mailto:jacqueline.marvel@inserm.fr)

Character count: 38504

Short title: Innate memory CD8 T cells characterization.

## **Abstract (183 words, max 200)**

The pool of memory-phenotype CD8 T cells is composed of antigen-induced (AI) and cytokine-induced innate (IN) cells. Experimentally generated IN have been extensively described, however few studies have characterized polyclonal IN cells generated under physiological conditions. In order to perform this characterization we search for marker that discriminated IN from AI memory cells. We demonstrate that unlike AI, IN memory CD8 T cells do not express NKG2D and CCL5. Using CCL5 expression we observe a similar dichotomy in the pool of human memory CD8 T cells. Exploiting NKG2D lack of expression by IN, we compared the properties of naturally-generated polyclonal IN memory CD8 T cells to naïve and AI memory CD8 T cells. We show that these cells produce the same array of cytokine as AI memory cells and that they express a memory cells transcriptome that differs from AI memory cells in its transcription factor expression-pattern. However, IN memory CD8 T cell are similar to naïve cells as they have a diversified repertoire, do not express beta1 integrins that are essential for tissue extravasation and are not recruited to the inflamed lung.

## **Introduction**

One hallmark of the adaptive immune system is its ability to respond faster and stronger to previously encountered antigens (Ag). This immunological memory relies on the generation of cells that display increase reactivity towards the previously encounter Ag. Protection against intracellular pathogens or tumor-derived Ag relies on the generation of Ag-induced memory CD8 T cells (AI). Indeed, AI memory CD8 T cells have increased functional properties compared to naive cells, making them more potent to rapidly eliminate infected cells upon re-infection (Veiga-Fernandes et al., 2000). However, memory phenotype CD8 T cells can also be generated through alternative pathways that are independent of foreign Ag exposure. Recently a unified nomenclature has been proposed for these cells: the innate memory cells (IN) that we will use here after (Jameson et al., 2015). Several mechanisms of IN memory CD8 T cell generation have been identified. Memory CD8 T cells generated through lymphopenia-induced proliferation (LIP) were the first IN memory cells to be described (Ernst, 1999; Goldrath and Bevan, 1999; Goldrath et al., 2000; Kieper and Jameson, 1999; Murali-Krishna and Ahmed, 2000). This particular memory cell generation depends on strong IL-7 stimulation of naive CD8 T cells (due to the increased availability of this  $\gamma$ c cytokine in the lymphopenic host) combined to weak TCR stimulation through self-peptide/MHC-complexes (Goldrath et al., 2002; Jameson, 2002; Sprent and Surh, 2011). LIP memory cell generation occurs in physiological conditions. Indeed, memory phenotype CD8 T cells appear during the neonatal period in naive mice, in part due to natural lymphopenic conditions provided by such environment (Akue et al., 2012; Le Campion et al., 2002; Schüler et al., 2004). Other  $\gamma$ c cytokines also support the generation of IN memory cells. *In vivo*, strong IL-2 stimulation through injection of IL-2/anti IL-2 antibody complexes, was shown to drive the generation of IN memory CD8 T cells from naive OTI cells (Kamimura and Bevan, 2007). The characterization of several mutant mouse strains revealed that strong IL-4 stimulation of CD8 single positive thymocytes or naive CD8 T cells leads to IN memory cell generation (Lee et al., 2011; Weinreich et al., 2010; Kurzweil et al., 2014). Moreover, naive BALB/c mice have increased proportion of memory phenotype CD8 T cells due to higher IL-4 production compared to naive C57BL/6 mice, (Lee et al., 2013b). Conversely, naive SPF mice deficient for IL-4 production or signaling have reduced frequency of IN memory CD8 T cells (Akue et al., 2012; Sosinowski et al., 2013). Finally, Th2 immune responses might also favor the generation of IN memory CD8 T cells, as endogenously produced IL-4 support the proliferation of CD8 T cells (Morris et al., 2009).

Hence in naïve Specific Pathogen Free (SPF) mice, among CD8 T cells that are specific of various foreign Ag never encountered by the naïve SPF mice, 10-20% of cells display a memory phenotype (Haluszczak et al., 2009). Compared to naive cells, these unconventional Ag-specific memory cells are able to mount an efficient response against pathogen infection with increased functional properties including augmented IFN- $\gamma$  production and proliferative response (Haluszczak et al., 2009; Lee et al., 2013a). Importantly, equal numbers of these Ag-specific cells were found in naive germ free mice, indicating that their generation is independent of microbiota-derived Ag (Haluszczak et al., 2009). Therefore, in physiological conditions, the pool of memory phenotype CD8 T cells is composed of two classes of cells: AI and IN.

AI and IN CD8 memory cells are generated through distinct pathways, but both express conventional memory markers that distinguish memory from naive cells, thus polyclonal AI and IN memory CD8 T cells have been difficult to discriminate. As a consequence, polyclonal IN memory CD8 T cell population has never been fully characterized. Interestingly, experimentally generated IN OTI memory CD8 T cells do not express CD49d compared to AI OTI memory CD8 T cells. This lack of CD49d expression has been used to identify and characterize OVA and VV specific clones of IN generated in physiological conditions (Haluszczak et al., 2009). In order to characterize polyclonal IN memory CD8 T cells generated in physiological conditions, we have search new markers that could discriminate between polyclonal IN and AI memory CD8 T cells. Upon strong TCR triggering, CD8 T cells express high levels of the NK cell receptor NKG2D as well as the pro-inflammatory chemokine CCL5 (Ortiz et al., 1997; 1996; Diefenbach et al., 2000). We have previously demonstrated that IL-4 down-regulates both NKG2D and CCL5 expression by memory CD8 T cells (Marçais et al., 2006; Ventre et al., 2012). As IL-4 is involved in IN memory CD8 T cell generation, we hypothesized that these two proteins could be differently expressed between AI and IN memory CD8 T cell populations. We demonstrate that CCL5 and NKG2D expression is restricted to AI memory CD8 T cell populations. Using NKG2D we show that IN memory CD8 T cells generated under physiological conditions have both memory- and naive-like features.



## **Material and methods**

### *Mice*

F5 TCR transgenic mice were provided by Professor D. Kioussis (National Institute of Medical Research, London, U.K.) and backcrossed on CD45.1 C57BL/6 background. The F5 TCR recognizes the NP68 peptide from influenza A virus (ASNENMDAM) in the context of H2-D<sup>b</sup>. OTI TCR transgenic, CD45.2 (C57BL/6J) and CD45.1 (B6.SJL) C57BL/6, BALB/c and OF1 mice were purchased from Charles River Laboratories (L'arbresle, France). The OTI TCR recognizes the OVA<sub>257-264</sub> peptide from chicken ovalbumin (SIINFEKEL) in the context of H2-K<sup>b</sup>. Mice were bred or housed under SPF conditions in our animal facility (AniRA-PBES, Lyon, France). All experiments were approved by local ethics committee (CECCAPP, Lyon, France).

### *Pathogens and mouse immunization*

The recombinant influenza virus strain WSN encoding the NP68 epitope (Flu) was produced by reverse genetics from the A/WSN/33 H1N1 strain. The recombinant vaccinia virus expressing the NP68 epitope (VV) was engineered from Modified Vaccinia virus Ankara by Dr. Denise Yu-Lin Teoh in Pr. Sir Andrew McMichael's laboratory at the MRC (Human Immunology Unit, Institute of Molecular Medicine, Oxford, UK). The *Listeria monocytogenes* strain 10403s was produced from clones grown from organs of infected mice. Anesthetized mice received intranasal administration of  $2 \times 10^5$  TCID<sub>50</sub> Flu,  $2.10^5$  PFU VV or 30µg Poly I/C in 20µL of phosphate-buffered saline or intravenous (IV) administration of  $2 \times 10^3$  Lm in 200µL phosphate-buffered saline. For some indicated experiment, mice received intraperitoneal (IP) administration of  $1 \times 10^6$  PFU VV in 200µL phosphate-buffered saline.

### *TCR transgenic memory CD8 T cells*

To generate AI TCR transgenic memory CD8 T cells,  $2 \times 10^5$  naive CD45.1 F5 CD8 T cells were transferred in C57BL/6 mice by IV injection. The next day, mice were infected with VV-NP68 as described above. To generate IN TCR transgenic memory CD8 T cells,  $1 \times 10^6$  naive OTI CD8 T cells were transferred in immunocompetent or sublethally irradiated (600 rad) CD45.1 C57BL/6 mice by i.v. injection. During 7 days, immunocompetent mice received daily intraperitoneal injection of 1.5µg of IL-2 or IL-4 (Peprotech) immunocomplexed to anti-IL-2 (S4B6, BioXcell) or anti-IL-4 (11B11, BioXcell) antibody.

### *Cell preparation and flow cytometry*

To discriminate between tissue resident and circulating memory CD8 T cells, *in vivo* intravascular staining was performed as previously described (Anderson, 2012). Briefly, mice were injected with 3 µg of CD45-BV421 antibody (BioLegend) diluted in 300 µl of sterile DPBS (Life Technologies) and were sacrificed 2 min after injection by overdose of pentobarbital. Blood samples (100µl) were collected on EDTA by retro-orbital bleeding. Spleen and lymph nodes were harvested and mechanically disrupted and filtered through a sterile 100 µm nylon mesh filter (BD). To collect broncho-alveolar lavages (BAL), the trachea was exposed and cannulated with a 24-gauge plastic catheter (BD Biosciences) and lung were lavaged 2 times with 1 ml cold sterile PBS. Lungs were enzymatically digested using a specific dissociation kit and following manufacturer's instructions (Miltenyi Biotec). Surface staining was performed on single cell suspensions from each organs for 30 min at 4°C with the appropriate mixture of monoclonal antibodies diluted in staining buffer (PBS (Life Technologies) supplemented with 1% FCS (Life Technologies) and 0,09% NaN<sub>3</sub> (Sigma-Aldrich, Saint Quentin-Fallavier, France)). To identify B8R specific memory CD8 T cells, tetramer staining was performed 10 min at room temperature before surface staining using B8R tetramer (Immudex). The following antibodies were used for surface staining: NKG2D (CX5), CD45.1 (A20), CD45.2 (104), CD122 (TM-b1), CD62L (MEL-14), CD8 (53-6.7), CD44 (IM7.8.1), CXCR3 (Cxc3-173), CD49a (HA 31-8), CD49d (R1-2), CD29 (eBioHMB1-1), CD11c (N418). To perform intracellular cytokine staining, cells were fixed and permeabilized using CytoFix/CytoPerm (BD Pharmingen). To detect transcription factors, FoxP3 Kit (BD Pharmingen) was used to fix and permeabilize cells. The following antibodies were used for intracellular staining: IFN-γ (XMG1.2), CCL5 (2E9), Tbet (4B10) and Eomes (Dan11mag). All analyses were performed on a Becton Dickinson FACSLSR II or Fortessa and analysed with FlowJo software (TreeStar, Asland, OR, USA).

### *Detection of CCL5 in human memory CD8 T cells*

PBMC from peripheral blood of healthy donors (EFS Lyon, France) were isolated by Ficoll density gradient (Eurobio).  $1 \times 10^6$  PBMC were cultured overnight in complete RPMI1640 medium (10% FCS, 10mM HEPES, 50µM βmercaptoethanol, 50µg/ml gentamicin, 2mM L-glutamin, all from Life Technologies) with Golgistop (1/1500, BD) at 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Cells were washed two times with fresh complete RPMI1640 medium and surface staining followed by intracellular staining were performed as described above. To identify Ag-specific

memory CD8 T cells, dextramer staining was performed at room temperature 10 min before surface staining using Flu (A\*0201/GILGFVFTL) and CMV (A\*0201/NLVPMVATV) dextramers (Immudex). The following antibodies were used: CD3 (OKT3) CD8 (SK1) CD45RA (HI100) CD62L (DREG56) CCL5 (2D5).

#### *In vitro stimulation and cytokines production measurements*

For measurements of cytokine amounts produced,  $5 \times 10^4$  naive and memory (NKG2D- and NKG2D+) CD8 T cells sorted from VV infected mice were cultured for 12 hours with plate bound anti-CD3 antibody (145-2C11, 10 $\mu$ g/ml, BD Biosciences), soluble anti-CD28 antibody (37.51, 1 $\mu$ g/ml, BD Biosciences) and IL-2 (2%). Supernatants were collected and cytokine production was measured by bead-based multiplexing technology for IL-1 $\alpha$ , IL1- $\beta$ , IL-3, IL-4, IL-9, IL-10, IL-13, IL-17, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , CCL2/3/4/5 (Bio-Plex Pro, Bio-Rad) or by ELISA for CCL1, CCL5, and IFN- $\gamma$  (Mouse DuoSet, R&D system). For measurements of cytokine production at single cell level,  $1 \times 10^5$  NKG2D- and NKG2D+ memory CD8 T cells sorted from VV infected mice were cultured for 6 hours with VV-infected (MOI = 10) DC2.4 cells or with PMA (20ng/ml) and Ionomycin (1 $\mu$ g/ml) in the presence of golgistop (BD). Alternatively,  $1 \times 10^6$  total splenocytes from VV-infected mice were cultured for 5 hours with plate bound anti-CD3 antibody and soluble anti-CD28 antibody or with IL-12 (10ng/ml, R&D system), IL-18 (10ng/ml, MBL) and IL-2 (10ng/ml, Peprotech).

#### *Protection assay*

To evaluate the degree of protection associated with each CD8 T cells population, mice were transferred with  $1 \times 10^5$  naive, NKG2D- or NKG2D+ memory CD8 T cells from Flu infected mice. The next day, host mice were infected with a lethal dose ( $1 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub>) of Flu. Mice were observed for illness and weight loss each day, for 12 days after infection. Mice that lost more than 20% of initial body weight were euthanized.

#### *TCR repertoire analysis*

Naive, NKG2D- and NKG2D+ memory CD8 T cells were sorted from VV-infected mice (50 days post infection). Cells were lysed and multiplex PCR were performed on genomic DNA to detect VJ rearrangements at the TCR  $\beta$  chain locus. Multiplex PCR were performed by ImmunID company (Grenoble, France). For each cell population, the percentage of TCR

repertoire diversity was calculated as the ratio between the number of observed VJ recombination and the theoretical number of VJ recombination (209).

### *Transcriptome analysis*

Ag F5 TCR transgenic memory CD8 T cells were generated as described above. 80 days after VV-NP68 infection, CD45.1 F5 memory CD8 T cells as well as host's NKG2D- and NKG2D+ memory CD8 T cells were sorted from 5 pools of spleens, each from eight mice (purity > 98%). Naive F5 and polyclonal CD8 T cells were sorted from three naive F5 and C57BL/6 mice respectively. Total RNA was extracted from dry cell pellets according to the "Purification of total RNA from animal and human cells" protocol of the RNeasy Micro Kit (QIAGEN, Hilden, Germany). Purity and integrity of the RNA was assessed on the Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent, Palo Alto, CA, USA). Total RNA from each sample was amplified, labeled and hybridized to mouse GeneChip HT MG-430 PM Plates as described in the Affymetrix GeneChip 3' IVT PLUS Reagent Kit User Manual (Affymetrix, Inc., Santa Clara, CA, USA). Affymetrix CEL files were analyzed in R using the Bioconductor suite of packages. Raw probe signals were background corrected using the maximum likelihood estimation of the normal-exponential mixture model (Silver et al., 2009), normalized using the variance stabilization normalization (Huber et al., 2002) followed by a quantile normalization (Bolstad et al., 2003). Summarization was performed using the median-polish (Irizarry et al., 2003) using a modified version 17.1 of the Entrez-Gene based reannotated chip description file (Dai et al., 2005). Non-informative genes were filtered using the I/NI algorithm (Talloon et al., 2007). Linear models were applied using the limma package in order to compute the average expression level for each cell type. A random effect was introduced to account for the paired design. Statistical contrasts were then applied to compute differential expression between the different cell types. The empirical Bayes method was used to compute moderated p-values that were then corrected for multiple comparisons using the Benjamini and Hochberg's false discovery rate (FDR) controlling procedure.

### *Measurement of transcription factors expression by qPCR*

Naive, NKG2D- and NKG2D+ memory CD8 T cells were sorted from VV infected mice (50 days post infection). Total RNA was extracted using TRIzol® reagent according to manufacturer's instructions (Life Technologies, Saint Aubin, France). Total RNA was DNase digested using turbo DNA-free DNase (Life technologies, Saint Aubin, France) to avoid genomic contamination. Quality and absence of genomic DNA contamination were assessed

with a Bioanalyzer (Agilent, Massy, France). We used High capacity RNA-to-cDNA kit (Life technologies, Saint Aubin, France) to generate cDNA for RT-PCR. PCR was carried out with a SybrGreen-based kit (FastStart Universal SYBR Green Master, Roche, Basel, Switzerland) on a StepOne plus instrument (Applied biosystems, Calrlsbad, USA). Primers were designed using the Roche website (Universal Probe Library Assay Design Center).

#### *Transwell assay*

$1 \times 10^6$  CD8 T cells purified from VV-infected mice (50 days post infection) were added to the upper chamber of polycarbonate transwell inserts (Corning, 5 $\mu$ m pore size). The lower chamber was filled with complete DMEM medium (6% FCS, 10mM HEPES, 50 $\mu$ M  $\beta$ mercaptoethanol, 50 $\mu$ g/ml gentamicin, 2mM L-glutamin, all from Life Technologies) alone or supplemented with CXCL10 (100ng, Peprotech). After two hours of incubation at 37°C, 7% CO<sub>2</sub>, transmigrated cells were collected in the lower chamber, washed and stained for CD8, CD44 and NKG2D. Absolute number of transmigrated cells was determined by flow cytometry by adding a known number of fluorescent beads (Flow-Count Fluorosphere, Beckman Coulter). Results are expressed as migration index, which represent the fold increase in the number of transmigrated cells in response to chemoattractant over the non-specific cell migration (medium alone).

## **Results**

### *NKG2D and CCL5 expression delineates two memory CD8 T cell populations generated through distinct pathway*

To test the hypothesis that NKG2D and CCL5 could discriminate AI from IN memory cells we first measured the expression of NKG2D and CCL5 by experimentally generated IN memory CD8 T cells (Figure S1). Neither IN generated by LIP or IN generated by IL-2 or IL-4 antibody complex did express CCL5 or NKG2D. Moreover, the majority (more than 80%) of memory phenotype CD8 T cells from naive SPF mice do not express CCL5 and NKG2D suggesting that in absence of antigenic stimulation the majority of these cells are IN (Figure 1A). We next sought to analyze NKG2D and CCL5 expression by memory CD8 T cells generated in response to pathogen infection. To do so, we analyzed CD44<sup>hi</sup> CD8 T cell populations (total, NKG2D-, NKG2D+, CCL5- and CCL5+) in the blood of individual mice during the course of an immune response against Vaccinia virus (VV) infection (Figure 1B). As expected, VV infection induced a strong increase in the total number of CD44<sup>hi</sup> CD8 T cells, followed by a decrease in CD8 T cell numbers, reflecting the contraction phase and the generation of memory cells (Figure 1B). A similar pattern was observed for CD44<sup>hi</sup> cell population defined by the expression of CCL5 or NKG2D (Figure 1B). During the memory phase (day 55 post-infection), we observed that the total number of memory phenotype CD8 T cells is higher compared to the one observed before infection, reflecting the generation of new memory CD8 T cells (Figure 1B). This observation is also true for NKG2D+ and CCL5+ memory phenotype CD8 T cells. Indeed, their number recovered during the memory phase is more than 8 fold higher compared to the one observed before infection (Figure 1B). On the other hand, we observed only a moderate increase of the number of NKG2D- and CCL5- memory phenotype CD8 T cells early after infection (Figure 1B). Moreover, the number of NKG2D- and CCL5- memory phenotype CD8 T cells during the memory phase is not significantly different to the one observed before infection. This reflects that few, if any, NKG2D- or CCL5- memory phenotype CD8 T cells were generated during an immune response against Vaccinia virus. This preferential expansion of CCL5-expressing memory CD8 T cells is not specific of immune response against VV, as the same observations were made for immune responses against other pathogens, respectively the Influenza virus (Figure 1C and S2) and the bacterium *Listeria monocytogenes* (Figure 1C and S2). Importantly, these results also demonstrated that CCL5 and NKG2D expression by memory CD8 T cells is strongly correlated (Figure S3). We next tried to extend these results to other mouse strains.



Increased IN memory CD8 T cell population has been described in BALB/c compared to C57Bl/6 mouse strain, due to an expanded IL-4-producing NKT cell population (Lee et al., 2011; Weinreich et al., 2010). In this context, NKG2D<sup>+</sup> and CCL5<sup>+</sup> memory CD8 T cells strongly expanded following VV infection and were maintained upon the memory phase (Figure S4). A similar result was obtained in an outbred mouse strain (OF1) (Figure S4). Taken together, our results show that memory phenotype CD8 T cells in unmanipulated animals are mainly NKG2D<sup>-</sup>-CCL5<sup>-</sup> and that an immune response against an intracellular pathogen mainly generates CCL5<sup>+</sup> NKG2D<sup>+</sup> expressing memory phenotype CD8 T cells. Thus, CCL5 and NKG2D expression could allow the distinction between AI and IN memory CD8 T cells.

*Polyclonal AI memory CD8 T cells are contained in the NKG2D<sup>+</sup> fraction of memory CD8 T cell pool*

We next sought to test whether, in polyclonal settings, all AI memory CD8 T cells express NKG2D and CCL5. First we looked at the phenotype of memory CD8 T cells specific for a dominant VV-derived epitope B8R. Results in Figure 2A indicate that all cells co-express CCL5 and NKG2D. Vaccinia virus harbor at least 40 epitopes recognized by CD8 T cells (Moutaftsi et al., 2006). Therefore, to extend this analysis to the whole viral genome, memory CD8 T cells were restimulated with VV-infected cells. More than half of NKG2D<sup>+</sup> memory phenotype CD8 T cells produced IFN $\gamma$  following VV restimulation, whereas less than 5% of NKG2D<sup>-</sup> memory phenotype CD8 T cells did. This lack of IFN $\gamma$  production is not due to a functional defect of NKG2D<sup>-</sup> memory phenotype CD8 T cells, as restimulation with PMA and ionomycin leads to a production of IFN $\gamma$  by more than 60% of these cells (Figure 2B). As some epitope of VV might be presented to CD8 T cells in a time course longer than the one used for *in vitro* restimulation, we performed *in vivo* rechallenge of memory CD8 T cells (Figure 4B). NKG2D<sup>-</sup> and NKG2D<sup>+</sup> memory CD8 T cells from VV-infected mice equally graft in hosts, 7 days post-transfer. 7 days post rechallenge with VV, NKG2D<sup>+</sup> memory phenotype CD8 T cells strongly proliferate, as revealed by the number of donor cells recovered in the spleen and lung of host mice (Figure 2C). In contrast, the number of donor NKG2D<sup>-</sup> memory phenotype CD8 T cells stayed close to the one observed in unimmunized host mice, revealing the absence of expansion following VV rechallenge. NKG2D<sup>+</sup> memory CD8 T cell proliferation was strictly dependent on Ag recognition, as infection with the heterologous pathogen Lm did not lead to their expansion (Figure 2C). Finally, we compared the capacity of NKG2D<sup>+</sup> and NKG2D<sup>-</sup> memory phenotype CD8 T cells to protect naive mice against a lethal dose of virus (Figure 2D). To do so, naive CD8 T cells as well as NKG2D<sup>-</sup>



and NKG2D<sup>+</sup> memory CD8 T cells from Flu-infected mice were transferred in hosts that were infected with a lethal dose of Flu. NKG2D<sup>+</sup> memory CD8 T cells induced a significant protection of host mice as more than 40% of them survive the infection (Figure 2D), this is in contrast to naive and NKG2D<sup>-</sup> cells that conferred no protection. Altogether, these results indicate that the majority of AI memory CD8 T cells are contained in the NKG2D<sup>+</sup> CCL5<sup>+</sup> fraction of a polyclonal memory CD8 T cell pool. Thus, CCL5 and NKG2D expression delineates AI and IN memory CD8 T cells in polyclonal settings.

#### *CCL5 expression defines AI memory CD8 T cell populations in human peripheral blood*

IN memory CD8 T cells have also been described in human (Jacomet et al., 2015). We next tested if CCL5 expression by human CD8 T cells could also be used to delineate IN and AI memory cells. As observed in mouse, human PBMC-derived naive CD8 T cells did not express CCL5. In contrast, we observed a heterogeneous expression of CCL5 among TCM, TEM and TEMRA memory CD8 T cell subsets (Figure 3A). CCL5<sup>-</sup> cells were observed in all subsets with the larger fraction being associated with the TCM subset, where they represented almost half of the cells (Figure 3A). This mirrors the distribution of CCL5<sup>+</sup> cells observed in TCM, TEM subsets in mice (Figure S5). We next used tetramer to identify antigen specific memory CD8 T cells and show that the majority of these cells express CCL5 (Figure 3B). Thus, these results suggested that in human, CCL5 might also be used as a biomarker to delineate AI and IN memory CD8 T cell populations.

Overall, in polyclonal settings, CCL5 and NKG2D expression can be used to define the two memory subsets AI and IN generated in physiological conditions. We thus use NKG2D expression to characterize in detail these two subsets.

#### *IN memory CD8 T cells have a diverse TCR repertoire and are recruited in primary response to pathogen infection*

Considering the different generation mode of IN and AI memory CD8 T cells we sought to characterize their TCR repertoire in terms of diversity and similarity. Multiplex PCR was performed to identify  $\beta$  chain locus VJ rearrangements present in naive and each subset of memory CD8 T cells population defined by NKG2D expression (Figure 4A, B). We first determined the global TCR diversity. Results in Figure 4A and B show that as expected AI memory CD8 T cells have a less diverse TCR repertoire compared to naive CD8 T cells, reflecting antigen selection. In contrast, IN memory CD8 T cells have a TCR repertoire that is as diverse as naive CD8 T cells (Figure 4B). Principal component analysis (PCA) performed

on these data indicates that the TCR repertoire is more similar within a subset that within the CD8 pool of a given mouse (Figure 4C). Thus, IN cells have a diverse repertoire that seems to differ in its composition from naive CD8 T cells. This prompted us to test whether these cells could participate to a primary immune response against a pathogen. Equal numbers of naive and IN memory CD8 T cells were sorted from naive mice and co-transferred to congenic hosts that were infected the next day with VV or Lm (Figure 4D). Seven days post infection, the recruitment of both naive and IN memory cells in the primary response was determined by measuring the increase in the number of NKG2D<sup>+</sup> effector cells in the spleen. We also evaluated the relative contribution of the two grafted cell populations to the NKG2D<sup>+</sup> CD44<sup>hi</sup> effector cells response. During VV infection, naive and IN memory CD8 T cells generated almost equal number of NKG2D<sup>+</sup> CD44<sup>hi</sup> effector cells. In contrast, we observed that IN memory CD8 T cells generated more NKG2D<sup>+</sup> CD44<sup>hi</sup> effector cells compared to naive cells during Lm infection (Figure 4D). Thus, the two subsets defined by NKG2D expression differ in the diversity of their repertoire and in its composition. IN cells have a more diversified repertoire than AI and, although different from naive cells, they are able to contribute to a primary response.

*IN and AI memory CD8 T cells show similar cytokine production patterns.*

One key property of memory CD8 T cells is the rapid and increased production of cytokines and chemokines upon TCR stimulation. We therefore compared the capacity of polyclonal IN and AI memory CD8 T cells to produce cytokines and chemokines in response to TCR stimulation. Naive and memory subsets were restimulated *in vitro* for 12h using anti-CD3/anti-CD28 antibodies. Cytokines and chemokines produced in the supernatant were analysed in a multiplex assay (Figure 5A). Our results showed that at early time points, IN and AI both produce a larger diversity and quantity of cytokines/chemokines than naive cells. Importantly, the same pattern of cytokines/chemokine was produced by IN and AI memory cells, although AI produced at least a ten fold higher quantity of the poised memory cytokine/chemokines CCL5, CCL1 and IFN $\gamma$  than IN (Figure 5B). In AI memory cells IFN $\gamma$  production by a fraction of cells can also be induced by innate signals such as IL-12 and IL-18, a property known as innate function of memory CD8 T cells (Soudja et al., 2012). To test the capacity of IN cells to respond to IL-12/IL-18, we performed an *in vitro* stimulation with these cytokine using anti-CD3-CD28 as a positive control. Our results show that a fraction of IN memory cells produce IFN- $\gamma$  upon a 5h stimulation, similarly to what observed for the CD3/CD28 stimulation an increased fraction of AI memory CD8 T cells also produce IFN- $\gamma$

(Figure 5C). This is in contrast to naive CD8 T cells that did not produce IFN- $\gamma$  in these conditions.

Taken together, these results indicate that IN memory CD8 T cells have acquired the capacity to rapidly produce cytokines that are poised in AI memory cells.

*IN memory CD8 T cells have a transcriptome typical of memory cells although they differ from AI memory cells.*

To further characterize the two subsets defined by NKG2D expression, we performed a microarray experiment to compare their transcriptome. F5 TCR transgenic CD8 T cells were transferred in naive mice before infection with VV-NP68, to set an internal control of AI memory CD8 T cell. Eighty days post infection, F5 memory cells as well as host's IN and AI memory CD8 T cell populations were sorted and their transcriptome was defined. Naive CD8 T cells sorted from naive F5 and C57BL/6 mice were used as control. We first performed a PCA analysis that shows that 70% of the variability between samples is explained by the first two principal components (PC). Samples were aligned along PC1 according to their differentiation stage, while PC2 highlighted a difference between monoclonal F5 TCR transgenic T cells and polyclonal CD8 T cells (Figure 6A). F5 and polyclonal cells, whether naive or memory, only differed by the expression of few genes, among which were found those coding for TCR's, reflecting the monoclonality of the F5 CD8 population (Figure S6A). Importantly, all genes differentially expressed by memory F5 CD8 T cells were also differentially expressed by AI memory CD8 cells isolated on the basis of NKG2D expression, confirming their antigen-induced nature. Of note, polyclonal AI cells uniquely expressed one set of genes coding for inhibitory NK cell receptors (*Klra*). Indeed, these Ly49 receptors are exclusively expressed by a small fraction of polyclonal memory CD8 T cells (Figure S6B), whether or not they express NKG2D (Figure S6C). IN memory cells were positioned closer to AI memory cells than to naive CD8 T cells on the PC1 axis, confirming their memory differentiation (Figure 6A). However, IN and AI memory CD8 T cells transcriptomes differ in the expression levels of several genes encoding transcription factors, effector molecules, NK cell receptors, chemokine receptors and integrins (Figure 6B). Importantly, AI memory CD8 T cells express higher levels of transcription factors that promote the full differentiation of CD8 T cells, such as Tbet, ID2, Zeb2 and Blimp-1 (Figure 6C and 6D). In contrast, IN memory CD8 T cells show increased levels of transcription factors that promote a less differentiated state of CD8 T cells, such as Eomes and ID3 (Figure 6C and 6D). The pattern of transcription factor expressed by IN memory cells is in accordance with their intermediate differentiation state.

*IN have a reduced capacity to access peripheral tissues compared to AI memory CD8 T cells*

Interestingly, AI also differed from IN by the expression level of integrins genes namely *Itgb1*, *Itga1* and *Itga4* coding for the alpha and beta chain of VLA1 (CD49a, CD29) and VLA4 (CD49d, CD29) (Figure 6B). This difference was confirmed at the protein level (Figure 7A). This family of integrin plays a key role in the control of cells extravasation within tissues, for example VLA1 is essential for effector CD8 T cells migration within the lung. Thus AI and IN might differ in their capacity to be recruited within tissues by inflammatory signals. To test this hypothesis, CD8 T cells purified from VV-infected mice were transferred into host mice that received intranasal injection of the TLR3 agonist Poly I/C (p(I:C) - Figure 7B). P(I:C) injection induces the production of type-I IFN (IFN-I) and its downstream chemokines (CXCL9, 10 and 11) (McNally et al., 2012). The recruitment of IN and AI memory cells in the lung was assessed two days later. Results in Figure 7B and C show a strong and preferential recruitment of AI memory CD8 T cells within the lung parenchyma and airways following P(I:C) injection. This was due to a preferential recruitment of AI as the same numbers of donor IN and AI memory CD8 T cells were found in the spleen and in the blood of recipient mice injected with PBS or p(I:C) (Figure 7B and 7C). The difference in recruitment of AI memory cells was not due to a difference in CXCR3 expression as both memory cell type express CXCR3 and show a strong migration capacity towards CXCL10 in a transwell assay (Figure 7D).

In conclusion, our results show that upon inflammation IN memory CD8 T cells are less efficiently recruited into peripheral tissues compared to AI memory CD8 T cells.

## **Discussion**

In this study, we demonstrated that CCL5 and NKG2D are exclusively expressed by AI memory CD8 T cells, allowing to discriminate them from IN memory CD8 T cells generated under physiological conditions, i.e. in absence of experimental intervention. We show that this dichotomy is conserved in different strains of mice and in human. Taking advantage of NKG2D expression, we performed a global characterization of the physiologically generated, polyclonal, IN memory CD8 T cell population. We performed a transcriptome comparison of IN and AI memory CD8 T cell populations. Our results clearly demonstrated that polyclonal (NKG2D<sup>+</sup> CD8 T cells) and monoclonal (F5 TCR transgenic CD8 T cells) VV-induced memory cells share the same transcriptome. IN have also acquired a genetic program typical of memory, nevertheless, these cells are less differentiated compared to AI memory CD8 T cells. Importantly, in agreement with a previous study (Goldrath et al., 2004), IN do not express a specific gene expression pattern that could indicate an independent differentiation pathway. This suggests that IN memory CD8 T cells represent an intermediate stage of differentiation between naive and AI memory CD8 T cells rather than a distinct CD8 T cell lineage. This is also supported by a similar but decreased cytokine secretion pattern in response to TCR stimulation compared to AI memory CD8 T cells. The differentiation in memory cells is regulated by different pairs of antagonist transcription factors (TF), such as Tbet/Eomes, Blimp1/Bcl6 or ID2/ID3 (Kaech and Cui, 2012). Interestingly, genes encoding for antagonist TF are differentially expressed between IN and AI memory CD8 T cells. Indeed, AI memory CD8 T cells express higher levels of genes encoding for TF that promote memory CD8 T cell full differentiation (*Tbx21*, *Id2*, *Prdm1*, *Zeb2*). In contrast, IN memory CD8 T cells express higher levels of genes encoding TF that favor a less differentiated state (*Id3*, *Eomes*). Thus, the expression pattern of TF observed in IN and AI memory CD8 T cell populations fits with the observed differentiation state. In agreement with their TF expression pattern, AI memory CD8 T cells express higher levels of genes encoding for effector molecules, such as granzymes, perforin and Fas ligand, confirming that these cells are more differentiated. One difference between polyclonal and monoclonal memory cells is the presence of a subset of cells expressing the Ly49 receptors. This previously described subset of cells is present among NKG2D<sup>+</sup> and NKG2D<sup>-</sup> memory cells and could harbor some regulatory activity (Rahim et al., 2014; Kim et al., 2011).

Previous studies have demonstrated that the integrin CD49d is differently expressed between B8R specific IN and AI memory CD8 T cells (Haluszczak et al., 2009; Sosinowski et al., 2013). Transcriptome comparison of IN and AI reveals that other genes coding for

integrin chains are also differentially expressed by AI and IN memory cells. This was confirmed at the protein level; indeed, AI memory CD8 T cells express high levels of several integrins (CD29, CD49a, CD49d) compared to naive or IN memory CD8 T cells. These integrins play a key role in immune cell migration, allowing them to exit blood vessels and access peripheral tissues (Nourshargh and Alon, 2014). Indeed, VLA1 (CD29, CD49a) and VLA4 (CD29, CD49d) play an essential role in the extravasation of CD8 T cells in the lung or the brain respectively. Accordingly, we find that upon lung inflammation, AI memory CD8 T cells are preferentially recruited within the lung parenchyma and airways compared to IN memory CD8 T cells that stay within the lung vasculature. Memory CD8 T cell trafficking to the lung parenchyma and airways has been reported to be dependent of the chemokine receptor CXCR3 (Slütter et al., 2013). Importantly, we did not observe any differential expression of CXCR3 or migration toward CXCL10 between IN and AI memory CD8 T cells. This suggests that the different access to inflamed lung tissue observed between memory cell populations might mainly rely on their different integrin expression pattern. The high level of expression of CXCR3 by IN cells could allow their repositioning within the lymph node following infection and contribute to their increased responsiveness (Kastenmüller et al., 2013; Lee et al., 2013a). Interestingly, we also found that the gene encoding the chemokine receptors CXCR5 and CCR7 are up-regulated in IN compared to AI memory CD8 T cells. These two chemokine receptors also control the positioning within secondary lymphoid organs (SLO). This could mean that IN and AI memory CD8 T cells could have different localization within SLO. Indeed, CXCR5 enables the localization of follicular T helper cells within the B cell follicles (Breitfeld et al., 2000; Schaerli et al., 2000). Interestingly, it has been reported that early after infection, IN memory CD8 T cells, generated through LIP, were mainly localized in the Periaarteriolar Lymph Sheath (PALS) and B cell follicles in the spleen, while AI memory CD8 T cells were mainly recruited to the marginal zone and the red pulp (Cheung et al., 2009). Thus, it would be interesting to compare the localization of AI and IN memory CD8 T cells within the spleen and lymph nodes in homeostatic as well as infectious context.

AI memory CD8 T cells have a more restricted repertoire than naive or IN memory cells reflecting the selection process that takes place during priming. In contrast, IN memory CD8 T cells have a TCR repertoire as diverse as naive CD8 T cells, although based on our analysis their repertoire might not completely overlap. This diversified TCR repertoire could allow IN memory CD8 T cells to be recruited in multiple immune response. In lines with this, we show that IN memory CD8 T cells participated to primary immune responses against two pathogens, namely VV and Lm. This observation is in agreement with the study of Haluszczak and colleagues, showing that B8R-specific clones are contained within the



population of IN memory CD8 T cells (Haluszczak et al., 2009). We show that naive and IN memory CD8 T cell populations equally contribute to the generation of NKG2D<sup>+</sup> effector cells during VV infection. However, in response to Lm, IN memory CD8 T cells contribute more to the generation of NKG2D<sup>+</sup> effector CD8 T cells than naive cells. This could be explained by an unequal repartition of pathogen specific clones between these two cell populations. Nevertheless, this could also be due to the increase sensitivity of IN memory CD8 T cells to Ag and/or inflammatory signals. Indeed, we show that IN memory CD8 T cells are responsive to IL12 a cytokine that is strongly induced during the course of Lm infection.

Participation of IN memory CD8 T cells to primary immune response against pathogen infection could significantly increase its efficiency. Indeed, we show that physiologically generated IN produce a lot more cytokines than naive cells when stimulated through their TCR. In line with this, Lee and colleagues demonstrated that Ova specific IN memory CD8 T cells cleared Lm-OVA infection more efficiently than naive CD8 T cells do (Lee et al., 2013a). Similarly, results obtained in mice that are deficient in IL-4 induced IN indicate a decreased capacity to control an LCMV infection in absence of these cells (Lee et al., 2015). This augmented protection could result from the increased responsiveness of IN, although one cannot exclude that they can provide a certain degree of help to naive CD8 T cells (Hugues et al., 2007).

Due to its generation process, the population of IN memory CD8 T cells might be preferentially generated from naive cells with increased sensitivity for self-antigens. Indeed, CD5<sup>hi</sup> naive CD8 T cells, that have an increased sensitivity to self antigens, are more potent to undergo LIP compared to CD5<sup>lo</sup> naive cells (Kieper et al., 2004) (Fulton et al., 2015). In NOD mice, increased lymphopenia drives the development of auto-aggressive T cells. This mechanism accounts partly for the development of diabetes in this mouse model (King et al., 2004). In this context, the decreased capacity of IN memory cells to access non-lymphoid tissues in response to inflammatory chemokines would be essential for the prevention of autoimmunity. In that respect they resemble naive CD8 T cells that also only circulate between the SLO. The exclusion from peripheral tissues of IN memory CD8 T cells that show increased reactivity compared to naive cells might thus be a key property that differentiates them from AI memory cells.

In conclusion, in this study we identified new tools enabling the discrimination between polyclonal IN and AI memory cell populations in a physiological context. Taking advantage of these tools, we demonstrated that IN memory cell population share features of naive and AI memory CD8 T cells.



## **Figure legends**

### **Main Figures**

**Figure 1: CCL5 and NKG2D expression delineates memory CD8 T cell populations generated through distinct pathway.** (A) NKG2D and CCL5 expression by memory phenotype (Mp) and naïve (Na) spleen CD8 T cells from 6 weeks naïve mice. Graph shows the mean percentage (+/- SD) of memory phenotype CD8 T cells that express (+) or do not express (-) CCL5 and NKG2D. One representative experiment out of three (n = 8 mice). Mann-Whitney test, \*\*\*: pvalue < 0.001. (B) Graphs show the mean number (+/- SD) of total, NKG2D- and NKG2D+ (upper panel) or CCL5- and CCL5+ (bottom panel) CD44<sup>hi</sup> CD8 T cells in the blood of VV infected mice. For each cell population, dotted line marks the mean number of cells observed before infection. (C) Graph shows mean expansion index (+/- SD) of CD44<sup>hi</sup> cell populations 55 days following pathogen infection. The dotted line marks an expansion index of 1, which represents an absence of expansion. One representative experiment out of two (n = at least 6 mice per group). Wilcoxon matched-pairs signed rank test, ns: not significant, \*: pvalue < 0.05, \*\*: pvalue < 0.01.

**Figure 2: Polyclonal AI memory CD8 T cells are contained in the NKG2D+ fraction of memory CD8 T cell pool.** (A) Naïve (Na) and B8R-specific memory CD8 T cells (B8R+) from VV-infected mice (> 100 days post infection) were assessed for their expression of NKG2D and CCL5. The percentage of NKG2D and CCL5 positive cells among B8R specific cells is shown. One representative experiment out of two (n = 3 mice). (B) NKG2D+ and NKG2D- memory CD8 T cells were sorted from VV-infected mice (55 days post infection). Cells were stimulated for 6 hours with VV-infected DC2.4 cells or with PMA/ionomycin (PMA/iono). The percentage of IFN- $\gamma$ + cells was measured by intracellular cytokine staining. Graph shows the mean percentage (+/- SD) of IFN- $\gamma$ + cells among each cell population. One representative experiment out of three (n = 5 mice). Mann-Whitney test, \*\*: pvalue < 0.01. (C) NKG2D+ and NKG2D- memory CD8 T cells were sorted from VV-infected CD45.1 mice (50 days post infection) and transferred in separated CD45.2 congenic mice. The next day, hosts were infected with VV, Lm or left uninfected ( $\emptyset$ ). Graphs show the mean number (+/- SD) of CD45.1 donor cells recovered 7 days post infection. One representative experiment out of four (n = 6 mice per group). Mann-Whitney test, ns: not significant, \*\*: pvalue < 0.01. (D) Naïve, NKG2D+ and NKG2D- memory CD8 T cells were cell sorted from Flu-infected mice (45 days post infection) and transferred in separated mice. The next day,

hosts were infected with lethal dose of Flu. Graph shows the percentage of survival observed among each group of mice. One representative experiment out of two (n = 10 mice per group). Log-rank (Mantel-cox) test, \*: pvalue < 0.05.

**Figure 3: CCL5 expression defines AI memory CD8 T cell populations in human peripheral blood.** (A) Human naive and memory CD8 T cell subsets, derived from healthy donor's PBMC, were assessed for their expression of CCL5 by flow cytometry. The percentage of CCL5+ cells is indicated. Graph shows the mean percentage (+/- SD) of CCL5+ cells. Four independent experiments are shown. Paired T test (n = 15 donors), \*\*\*\*: pvalue < 0.0001. (B) Human Flu- and CMV-specific memory CD8 T cells belonging to different memory subsets were identified by tetramer staining and assessed for their expression of CCL5 by flow cytometry. Graphs show the mean percentage (+/- SD) of CCL5+ cells among tetramer positive (Flu+ and CMV+) and tetramer negative (Tet-) memory CD8 T cells from different subsets. Four independent experiments are shown (n = 4 donors). Mann-Whitney test, ns: not significant, \*: pvalue < 0.05, \*\*: pvalue < 0.01.

**Figure 4: IN memory CD8 T cells have a diverse TCR repertoire and are recruited to primary immune responses against pathogens.** Naive, NKG2D- and NKG2D+ memory CD8 T cells were sorted from VV infected mice (50 days post infection) and multiplex PCR was performed on genomic DNA to detect VβJβ rearrangements among each cell population. (A) Graphs show the percentage of contribution of each VβJβ rearrangement to the TCR repertoire of each cell population. One representative mouse out of five is shown. (B) Graph shows the mean percentage (+/- SD) of TCR repertoire diversity, calculated as the ratio between the number of observed and theoretical VβJβ rearrangements. Mann-Whitney test (n = 5 mice), ns: not significant, \*: pvalue < 0.05, \*\*: pvalue < 0.01. (C) Principal component analysis showing the distribution of CD8 T cell populations regarding their VβJβ TCR repertoire. (D) Naive and NKG2D- memory CD8 T cells sorted from naive mice were transferred in congenic mice at a 1:1 ratio. Host mice were infected with VV, Lm or left uninfected (Ø). Left graph shows the mean number (+/- SD) in the spleen of CD44<sup>hi</sup> NKG2D+ CD8 T cells generated from transferred cell populations. Right graph shows the mean percentage (+/- SD) of contribution of each CD8 T cell population to the total CD44<sup>hi</sup> NKG2D+ CD8 T cells generated. One representative experiment out of two (n = 5 mice per group). Mann Whitney test, ns: not significant, \*\*: pvalue < 0.01.

**Figure 5: IN and AI memory CD8 T cells show similar cytokine production patterns.** Equal number of naive, NKG2D- and NKG2D+ memory CD8 T cells were sorted from VV

infected mice (> 100 days after infection) and were restimulated for 12 hours with anti-CD3 and anti CD28 antibodies in the presence of IL-2. (A) Radar plots show the mean amount of each cytokine produced. One representative experiment (n = 5 mice). (B) Graph shows the mean amount (+/- SD) of memory-associated cytokines produced by CD8 T cell populations. One representative experiment out of three (n = 5 mice). Mann-Whitney test, \*\*: pvalue < 0.01. ND: not detected. (C) Production of IFN- $\gamma$  by naive and memory (NKG2D- and NKG2D+) CD8 T cells from VV infected mice (50 days post infection) was measured by intracellular cytokine staining following 5 hours of restimulation with anti-CD3 and anti CD28 antibodies or with a mixture of IL-12/18/2. Graph shows the mean percentage (+/- SD) of IFN- $\gamma$ + cells among each CD8 T cell population. Two representative experiments (n = 4 mice). Mann-Whitney test, \*: pvalue < 0.05.

**Figure 6: IN memory CD8 T cells have a transcriptome typical of memory cells although they differ from AI memory cells.** Naive F5 CD8 T cells were adoptively transferred in host mice that were subsequently immunized with VV-NP68. 80 days post infection, F5 (TCR Tg) memory cells and host's (Polyclonal) NKG2D- and NKG2D+ memory CD8 T cells were sorted from 5 independent groups of mice. As a control, naive F5 and polyclonal CD8 T cells were sorted from 5 independent groups of naive F5 and C57BL/6 mice respectively. The transcriptome of these cell populations were compared by microarrays. (A) Principal component analysis was performed on whole microarray data. Left graph shows the distribution of samples according to Principal Components 1 and 2 (PC1 and PC2). Right graph shows the percentage of variance explained by successive principal components. (B) The main genes differently expressed between polyclonal NKG2D- and NKG2D+ memory CD8 T cells are listed. Fold change and pvalue are indicated for each gene. The family to which each group of genes belongs is also indicated. (C) Naive, NKG2D- and NKG2D+ memory CD8 T cells were sorted from VV-infected mice (50 days post infection). The expression level of several transcription factors by each cell population was assessed by quantitative PCR. Graph shows the mean fold increase (+/- SD) compare to naive CD8 T cells. One representative experiment (n = 5 mice). (D) The expression of Tbet and Eomes by naive, NKG2D- and NKG2D+ memory CD8 T cells from VV infected mice (50 days post infection) was assessed by flow cytometry. Graphs show mean of Mean Fluorescence Intensity (+/- SD) of each transcription factors. One representative experiment (n = 4 mice). Mann-Whitney test, \*: pvalue < 0.05.

**Figure 7: IN have a reduced capacity to access peripheral tissues compared to AI memory CD8 T cells.** (A) The expression of CD29, CD49a and CD49d by naive, NKG2D-

and NKG2D<sup>+</sup> memory CD8 T cells from VV infected mice (50 days post infection) was assessed by flow cytometry. Grey histogram: control isotype. One representative experiment out of three (n = 2 mice). (B and C) CD8 T cells were purified from VV-infected mice (IP immunization) and transferred into congenic mice. The next day, host mice received intranasal administration of Poly I/C or PBS. Two days later, the number of donor NKG2D<sup>-</sup> and NKG2D<sup>+</sup> memory CD8 T cells was measured in various organs. (B) Graphs show mean number (+/- SD) of donor NKG2D<sup>-</sup> and NKG2D<sup>+</sup> memory CD8 T cells. (C) Graph shows the mean ratio (+/- SD) between donor NKG2D<sup>+</sup> and NKG2D<sup>-</sup> memory CD8 T cells. The mean ratio in each organ is indicated. One representative experiment out of two (n = 5 mice per group). (D) Histogram shows the expression of CXCR3 by naive, NKG2D<sup>-</sup> and NKG2D<sup>+</sup> memory CD8 T cells from VV infected mice (50 days post infection). Grey histogram: control isotype. Migration of naive, NKG2D<sup>-</sup> and NKG2D<sup>+</sup> memory CD8 T cells from VV infected mice (50 days post infection) toward CXCL10 was assessed using transwell assay. Graph shows the mean migration index (+/- SD) for each cell population. One representative experiment out of three (n = 5 mice). Mann-Whitney test, ns: not significant, \*: pvalue < 0.05, \*\*: pvalue < 0.01.

### **Supplementary figures**

**Figure S1: Experimentally induced innate memory CD8 T cells do not express NKG2D and CCL5.** CD45.2 OTI TCR transgenic naive CD8 T cells were adoptively transferred in immunocompetent or sub lethally irradiated (highlighted by irradiation symbol) congenic mice. The next day, immunocompetent hosts received 7 intraperitoneal injections (one per day) of the indicated  $\gamma$ c cytokine (IL-2 or IL-4) immunocomplexed to an antibody against this cytokine. 30 days after transfer, the expression of CD44, CXCR3, CCL5 and NKG2D by OTI CD8 T cells was assessed by flow cytometry. Black histogram: OTI CD8 T cells, grey histogram: host's CD8 T cells. The percentage of OTI cells expressing each protein is indicated on each graph. One representative experiment out of four is shown, (n = 3 mice).

**Figure S2: Preferential expansion of CCL5<sup>+</sup> NKG2D<sup>+</sup> memory phenotype CD8 T cells following Lm or Flu infection.** 6 weeks old mice were infected with Lm (A) or Flu (B). For each pathogen, graphs show the evolution of the mean number (+/- SD) of total, NKG2D<sup>-</sup> and NKG2D<sup>+</sup> (upper panel) or CCL5<sup>-</sup> and CCL5<sup>+</sup> (lower panel) memory phenotype CD8 T cells in the blood during pathogen infection. Dotted lines mark the mean number of cells observed

before infection. One representative experiment (n = 10 mice per group). Wilcoxon matched-pairs signed rank test, ns: not significant, \*: pvalue < 0.05, \*\*: pvalue < 0.01.

**Figure S3: Co expression of CCL5 and NKG2D by a subset of memory CD8 T cells.** (A) Blood, spleen and lymph nodes were harvested from VV infected mice (> 100 days post infection) and the expression of CCL5 and NKG2D by memory phenotype CD8 T cells was measured by flow cytometry. The percentage of each cell population among memory phenotype CD8 T cells is indicated. One experiment out of three (n = 3 mice). (B) Linear regressions between the number of NKG2D-expressing and CCL5-expressing memory phenotype CD8 T cells observed in the blood of VV-infected mice at various time point post infection. The time post infection is indicated above each graph. The fitness of each linear regression is indicated by the  $r^2$  coefficient. One representative experiment out of two (n = 10 mice).

**Figure S4: NKG2D and CCL5 expression delineates memory CD8 T cell classes in BALB/c and OF1 mouse strains.** BALB/c and OF1 mice were infected with VV. (A) CCL5 and NKG2D expression by blood-derived memory phenotype (MP, CD44<sup>hi</sup> CD122+) and naive (Na) CD8 T cells was measured by flow cytometry before (D0) and 55 days after infection (D55). The percentage of CCL5+ and NKG2D+ cells are indicated (B) Graph shows mean expansion index (+/- SD) of each memory phenotype CD8 T cell populations following infection by VV. For each cell population, the expansion index was calculated as the ratio between the number of cells observed in the blood of each individual mouse 55 days post infection and the number of cells observed before infection. The dotted line marks an expansion index of 1, which represents an absence of cell population expansion. One representative experiment out of two (n = 13 mice). Wilcoxon matched-pairs signed rank test, \*: pvalue < 0.05, \*\*: pvalue < 0.01, \*\*\*: pvalue < 0.001.

**Figure S5: Expression of CCL5 by murine TCM and TEM memory CD8 T cell subsets.** Spleen were harvested from VV-infected mice (50 days post infection) and expression of CCL5 by TCM (CD62L+) and TEM (CD62L-) memory phenotype CD8 T cells was assessed by flow cytometry. The percentage of CCL5+ cells among each memory CD8 T cell subset is indicated. One representative experiment out of three (n = 2 mice).

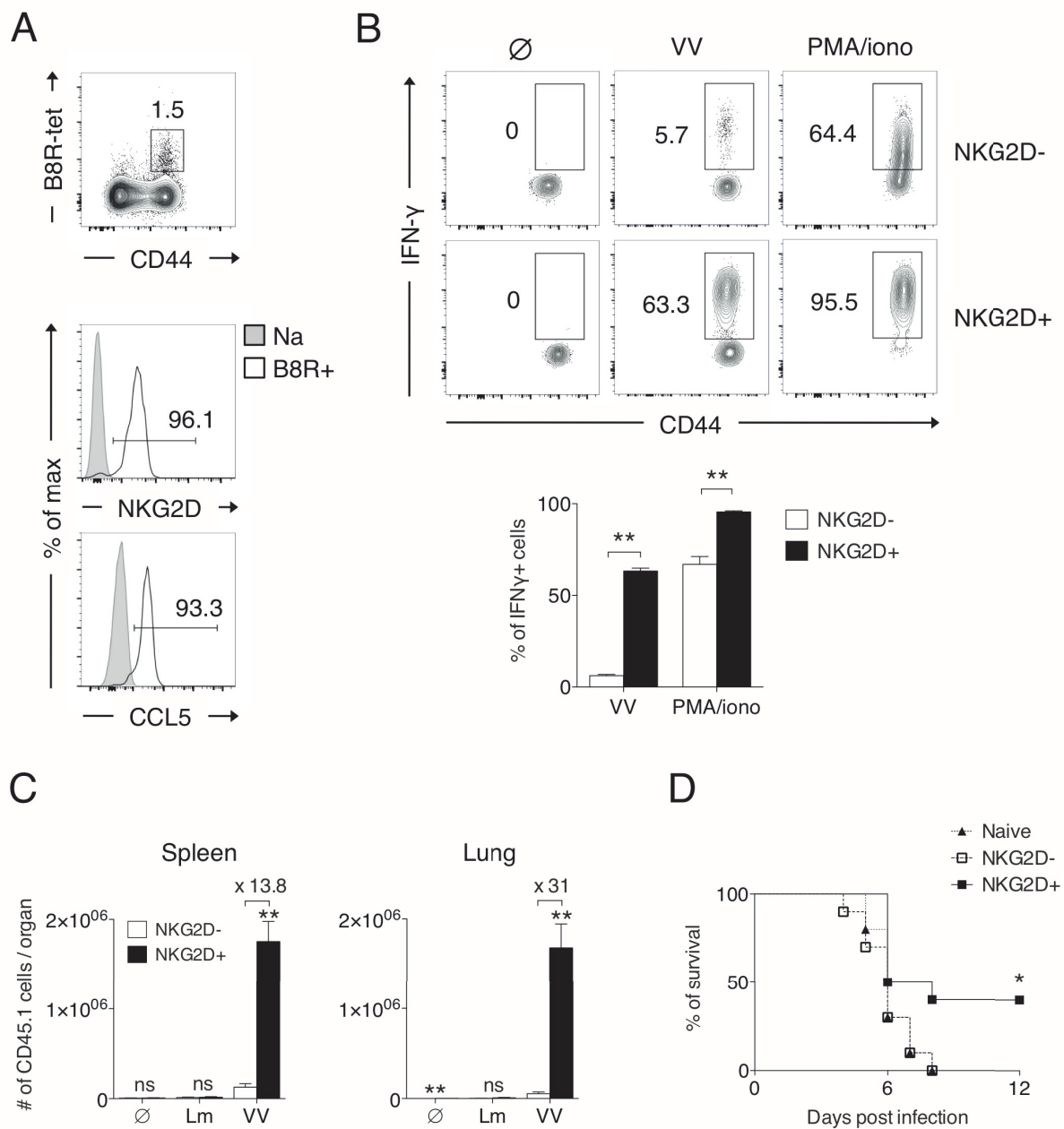
**Figure S6: Ly49A, E, F and G2 receptors are exclusively expressed by a subset of polyclonal memory CD8 T cells.** (A) Genes differentially expressed between F5 TCR transgenic and polyclonal AI memory CD8 T cells (Fold change > 2, pvalue < 0.001). Genes

encoding TCR's and *Klra* are highlighted in green and orange respectively. (B) Expression of Ly49A, E, F and G2 receptors by F5 and polyclonal memory CD8 T cells from VV-NP68 – infected mice (50 days post infection) was assessed by flow cytometry. (B) Expression of Ly49A, E, F and G2 receptors and NKG2D by memory CD8 T cells from VV infected mice (50 days post infection). The percentage of each cell population among memory phenotype CD8 T cells is indicated. One representative experiment out of two (n = 2 mice).





**Figure 2**



A



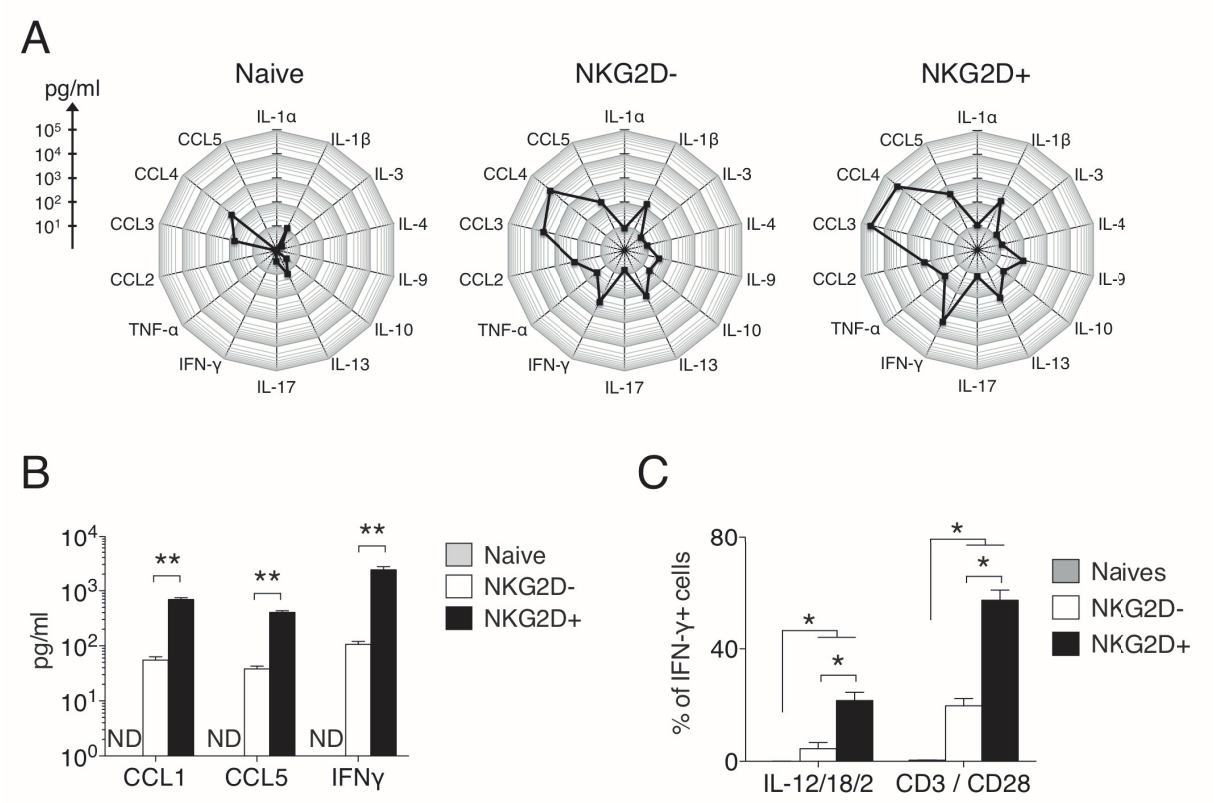
**A**

**B**

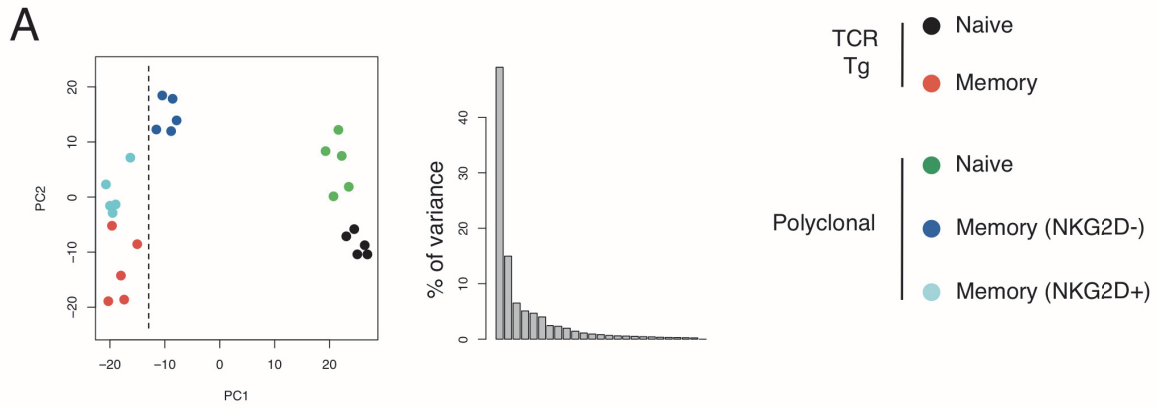
**C**

**D**

Figure 5



**Figure 6**



**B**

■ Up-regulated in NKG2D- □ Up-regulated in NKG2D+

Gene Family	Gene symbol	Name	Fold-change	p-value
Transcription factors	<i>Id3</i>	inhibitor of DNA binding 3	1.8	1.3e-4
	<i>Eomes</i>	eomesodermin homolog ( <i>Xenopus laevis</i> )	1.3	2e-4
	<i>Rora</i>	RAR-related orphan receptor alpha	2.8	1.2e-7
	<i>Id2</i>	inhibitor of DNA binding 2	2.6	4.6e-18
	<i>Tbx21</i>	T-box 21	1.6	1.6e-3
	<i>Prdm1</i>	PR domain containing 1, with ZNF domain	1.3	6.7e-3
	<i>Zeb2</i>	Zinc Finger E-box binding homeobox 2	1.3	3.9e-3
Effector molecules	<i>Gzma</i>	granzyme A	3.4	1.3e-11
	<i>Fasl</i>	Fas ligand (TNF superfamily, member 6)	3.3	5.7e-15
	<i>Gzmb</i>	granzyme B	2.0	2.8e-9
	<i>Gzmk</i>	granzyme K	1.9	1.9e-6
	<i>Prf1</i>	perforin 1 (pore forming protein)	1.8	7.2e-5
NK receptors	<i>Klrk1</i>	killer cell lectin-like receptor subfamily K, member 1	36.2	2.9e-30
	<i>Klrc1</i>	killer cell lectin-like receptor subfamily C, member 1	5.5	4.5e-9
	<i>Klrb1c</i>	killer cell lectin-like receptor subfamily B member 1C	2.5	2.1e-13
	<i>Klrg1</i>	killer cell lectin-like receptor subfamily G, member 1	2.4	2.4e-9
	<i>Klre1</i>	killer cell lectin-like receptor family E member 1	1.7	3.1e-6
	<i>Klrc3</i>	killer cell lectin-like receptor subfamily C, member 3	1.6	4.4e-5
Chemokine receptors	<i>Cxcr5</i>	chemokine (C-X-C motif) receptor 5	2.1	8.1e-10
	<i>Ccr7</i>	chemokine (C-C motif) receptor 7	1.8	3.5e-4
	<i>Cxcr6</i>	chemokine (C-X-C motif) receptor 6	2.7	1.5e-10
	<i>Ccr2</i>	chemokine (C-C motif) receptor 2	1.8	1.6e-5
	<i>S1pr5</i>	sphingosine-1-phosphate receptor 5	1.8	4e-9
Integrins	<i>Itgax</i>	integrin alpha X	4.0	4.6e-22
	<i>Itga1</i>	integrin alpha 1	2.6	3.7e-15
	<i>Itgb1</i>	integrin beta 1	2.2	2.5e-9
	<i>Itga4</i>	integrin alpha 4	2.0	1e-10

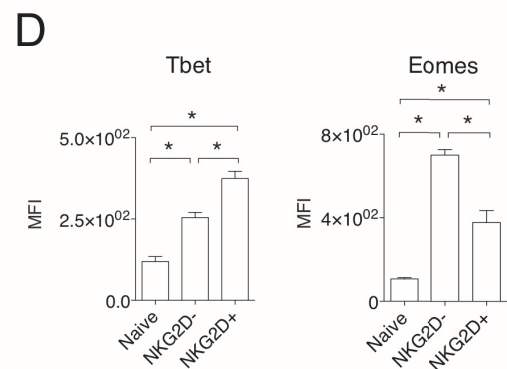
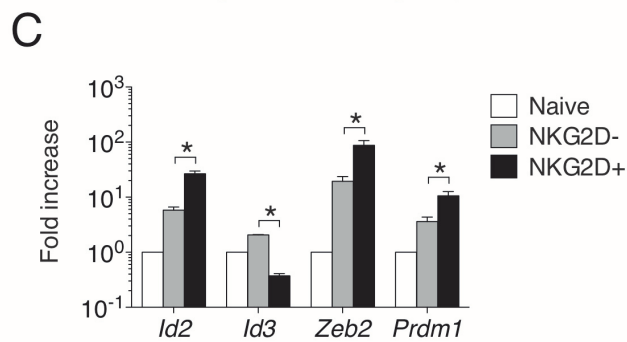


Figure 7

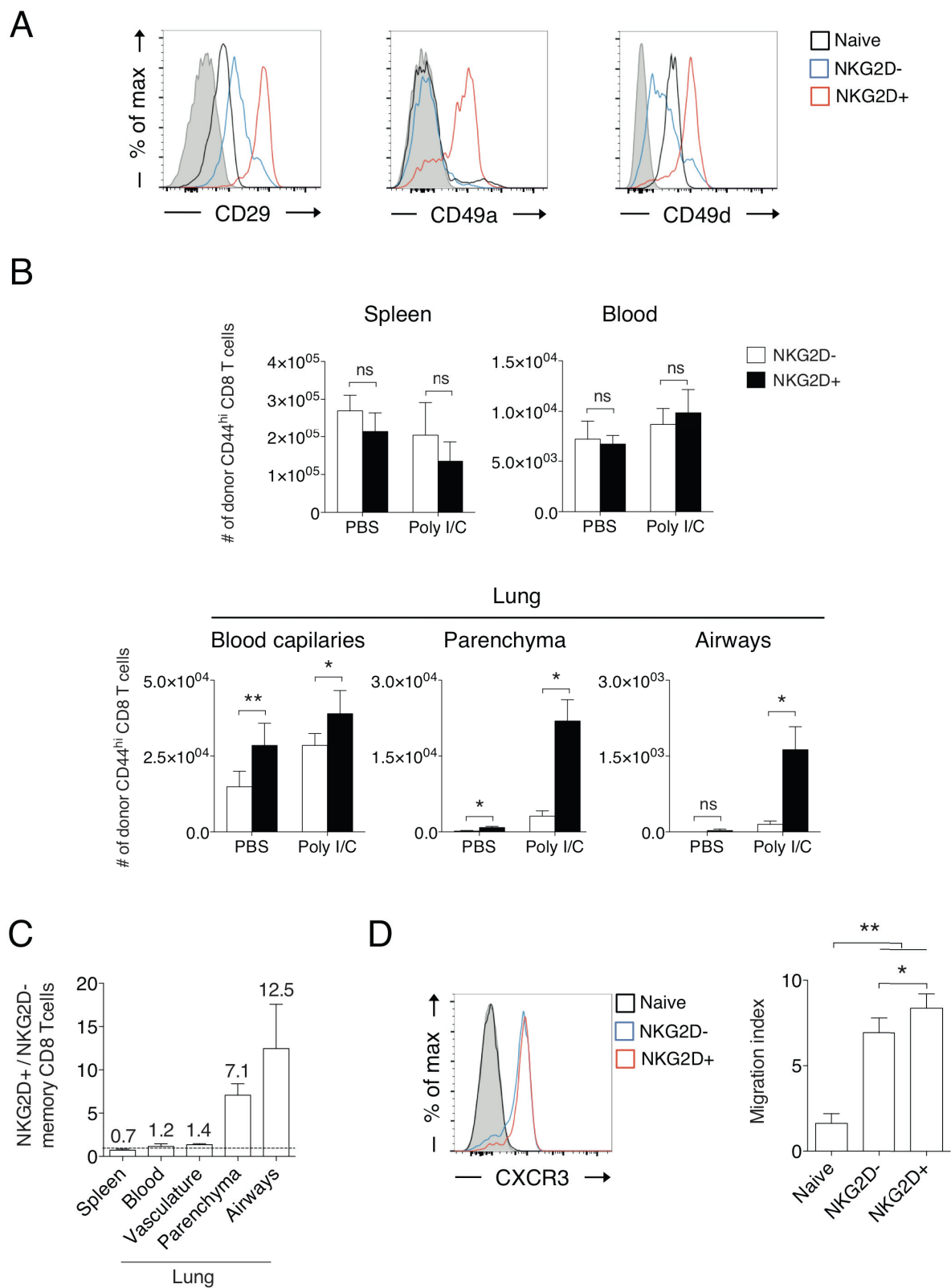


Figure S1

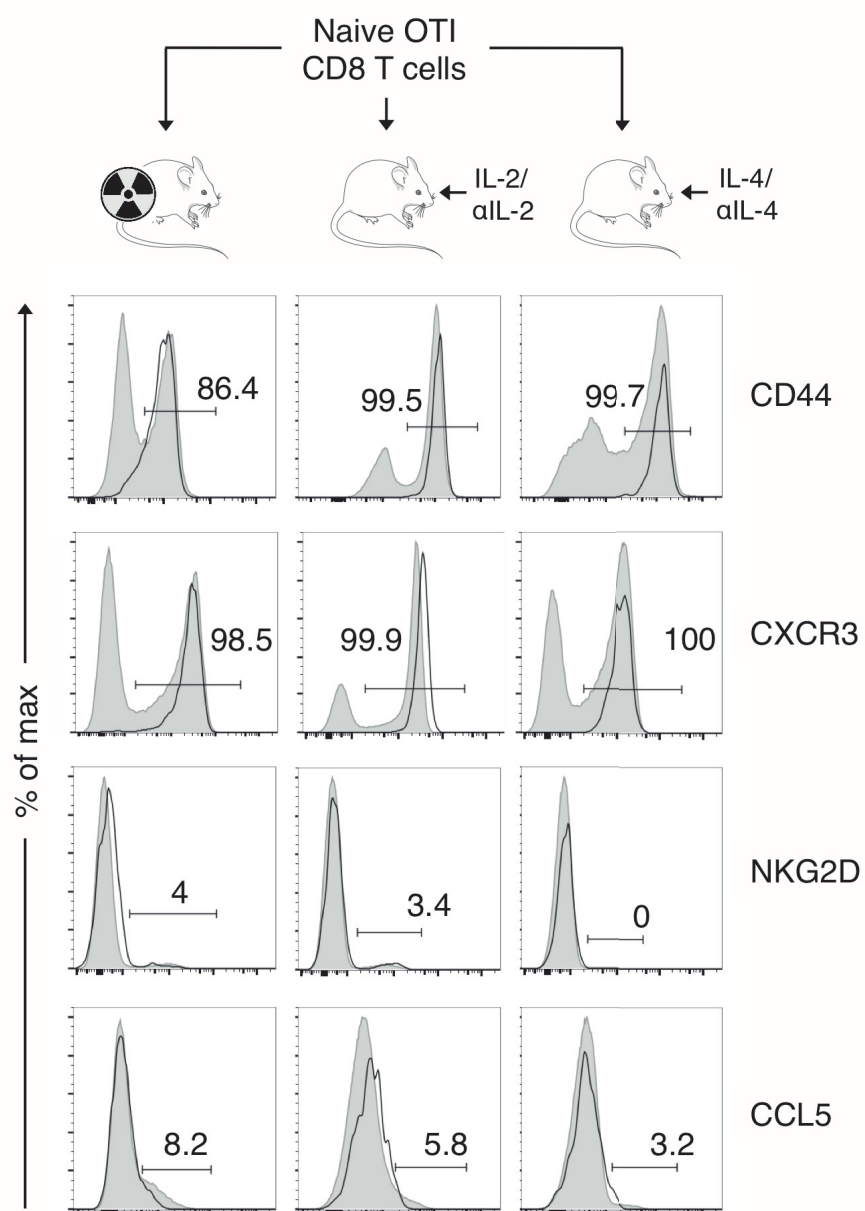
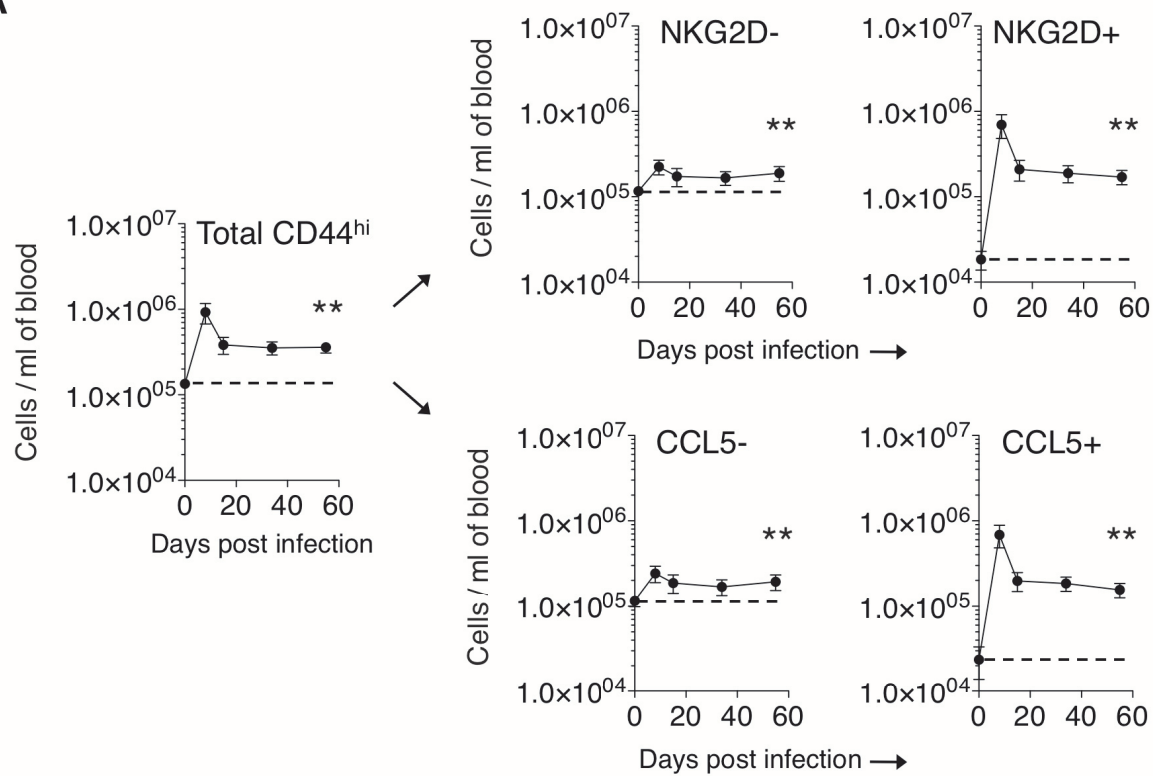




Figure S2

A



B

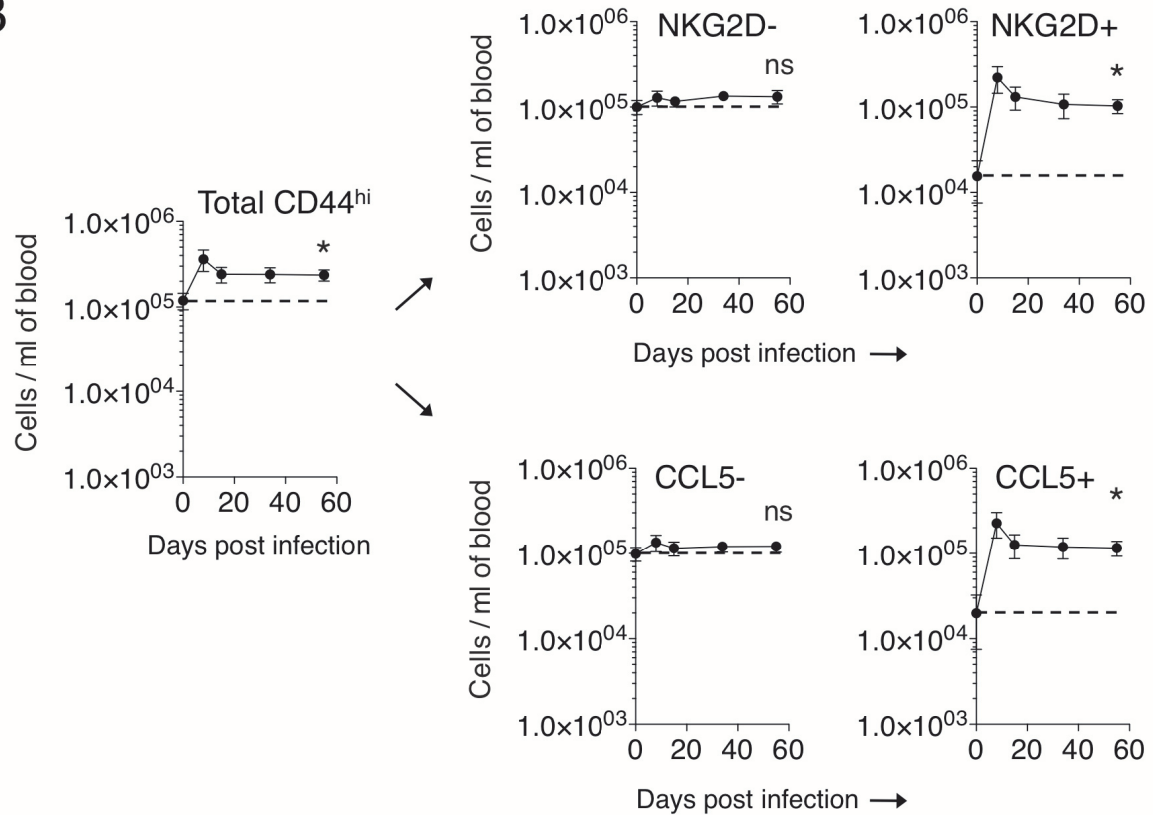


Figure S3

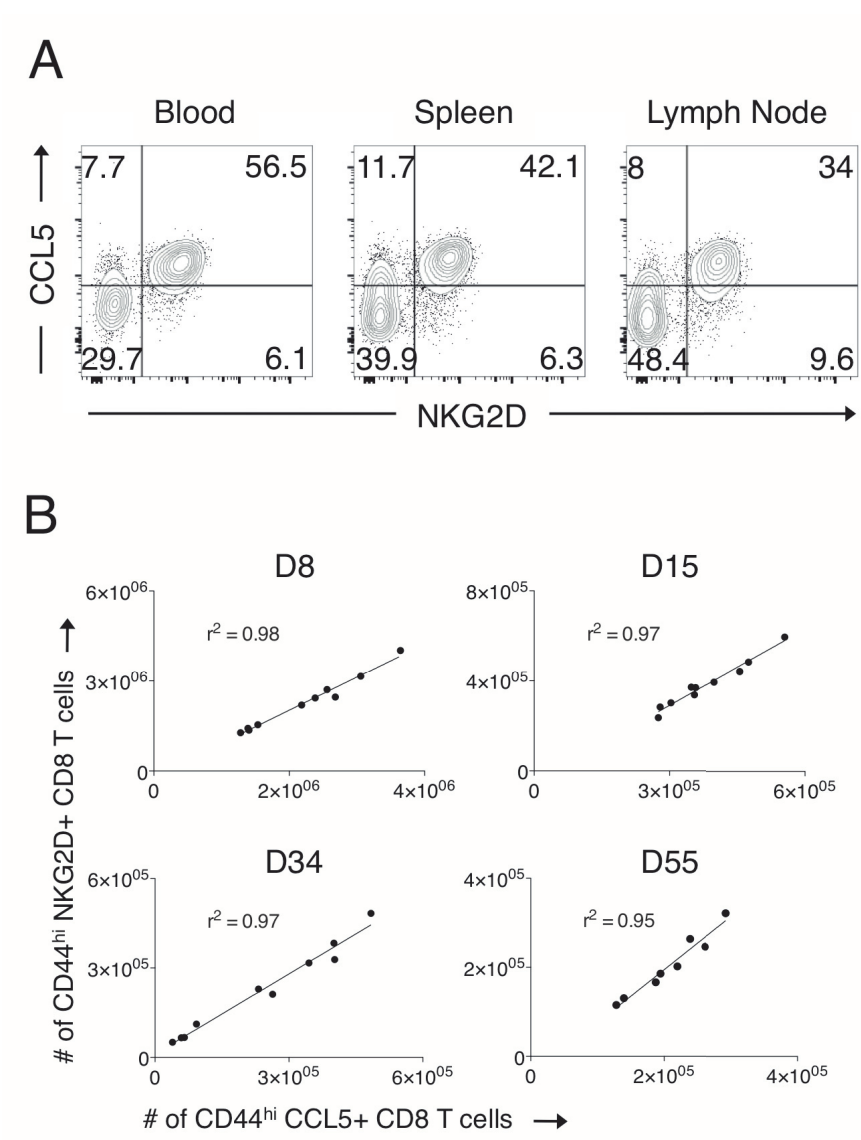
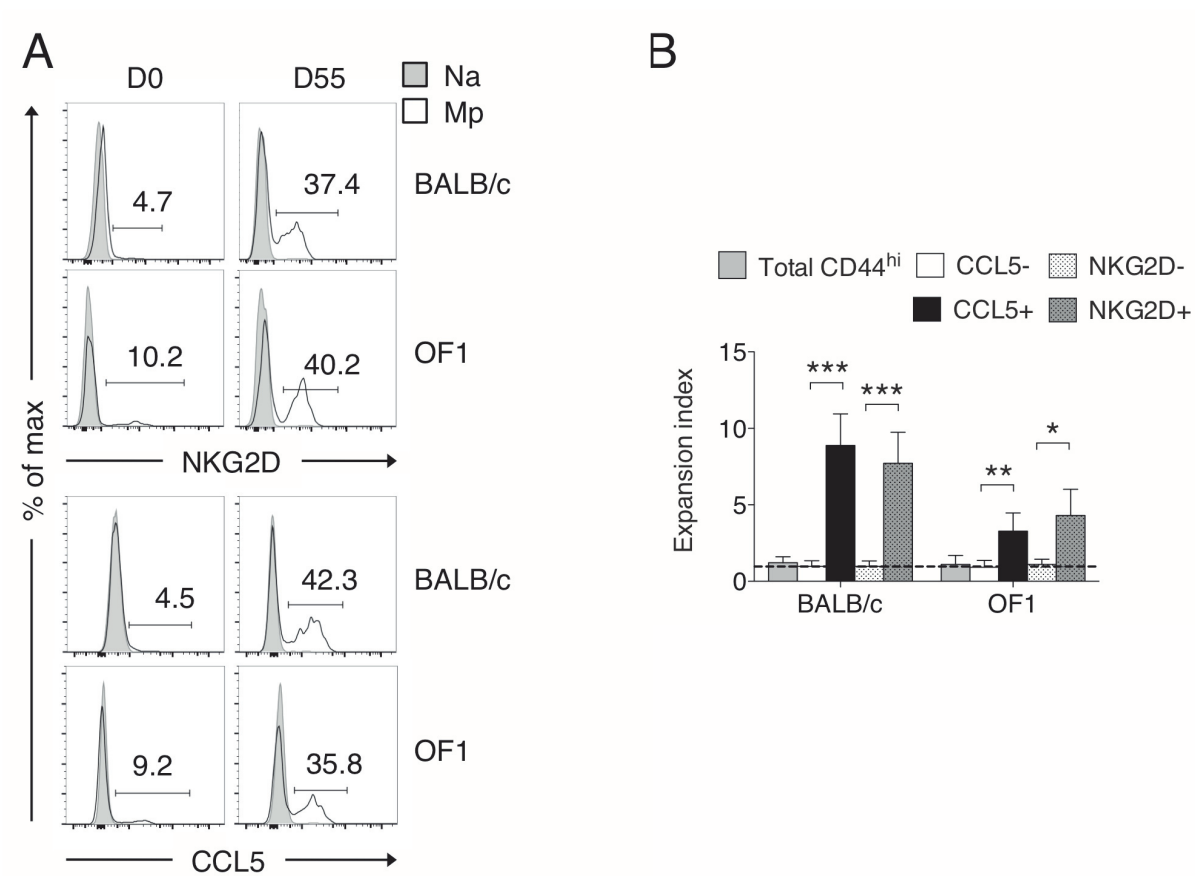
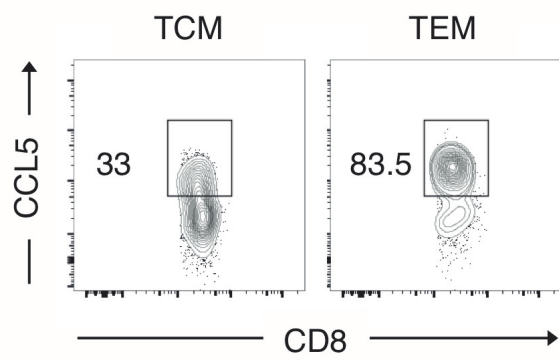


Figure S4



**Figure S5**

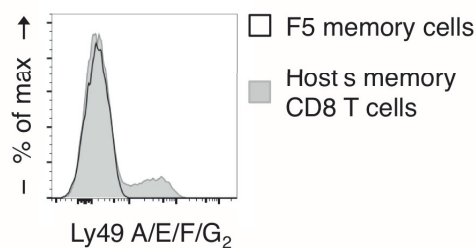


**Figure S6**

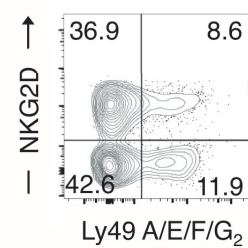
**A**

Symbol	Name	fold-change	p-value
CTSE	cathepsin E	x24.7	2.749e-33
KLRA7	killer cell lectin-like receptor, subfamily A, member 7	/11.9	1.636e-23
TRDC	T cell receptor delta, constant region	x9.4	1.063e-35
TRBV14	T cell receptor beta, variable 14	/7.2	3.724e-18
IFITM3	interferon induced transmembrane protein 3	x7.2	1.428e-27
TRBV5	T cell receptor beta, variable 5	/5.9	1.785e-18
PDCD1	programmed cell death 1	/5.5	2.65e-19
KLRA1	killer cell lectin-like receptor, subfamily A, member 1	/5.1	2.042e-17
KLRE1	killer cell lectin-like receptor family E member 1	/5.1	4.219e-23
CD5	CD5 antigen	/5.0	2.029e-20
IFITM1	interferon induced transmembrane protein 1	x4.6	5.165e-17
CD6	CD6 antigen	/4.3	6.466e-20
KLRA7	killer cell lectin-like receptor, subfamily A, member 7	/3.3	1.655e-15
GZMA	granzyme A	/3.2	4.426e-11
IFITM2	interferon induced transmembrane protein 2	x3.0	6.04e-12
CD163L1	CD163 molecule-like 1	/2.9	1.325e-23
ST8SIA1	ST8 alpha-N-acetyl-neuraminide alpha-2,8-sialyltransferase 1	x2.7	4.464e-14
B4GALNT4	beta-1,4-N-acetyl-galactosaminyl transferase 4	x2.6	2.399e-9
RAMP3	receptor (calcitonin) activity modifying protein 3	/2.5	4.658e-6
TRBJ2-2	T cell receptor beta joining 2-2	/2.5	1.802e-11
DAPL1	death associated protein-like 1	/2.5	3.725e-10
IKZF2	IKAROS family zinc finger 2	/2.5	4.274e-12
GPR34	G protein-coupled receptor 34	x2.4	1.56e-16
ITGA6	integrin alpha 6	/2.4	6.563e-9
AA467197	expressed sequence AA467197	x2.3	3.391e-12
EZH2	enhancer of zeste homolog 2 (Drosophila)	/2.2	2.223e-12
CDH1	cadherin 1	x2.2	2.067e-8
CAR2	carbonic anhydrase 2	/2.2	3.405e-10
KLRG1	killer cell lectin-like receptor subfamily G, member 1	/2.2	2.29e-8
UNC5CL	unc-5 homolog C (C. elegans)-like	/2.1	1.456e-15
ACPP	acid phosphatase, prostate	/2.1	5.527e-9
2810417H1			
3RIK	RIKEN cDNA 2810417H13 gene	/2.1	1.078e-10
RRM2	ribonucleotide reductase M2	/2.1	5.469e-9
EMP1	epithelial membrane protein 1	x2.1	2.52e-6
TTC39C	tetratricopeptide repeat domain 39C	x2.1	4.228e-11
ITM2A	integral membrane protein 2A	/2.0	3.024e-12
PSEN2	presenilin 2	/2.0	4.365e-13
FNDC3B	bronectin type III domain containing 3B	/2.0	9.262e-15

**B**



**C**



## **References**

- Akue, A.D., J.-Y. Lee, and S.C. Jameson. 2012. Derivation and maintenance of virtual memory CD8 T cells. *J. Immunol.* 188:2516–2523. doi:10.4049/jimmunol.1102213.
- Bolstad, B.M., R.A. Irizarry, M. Astrand, and T.P. Speed. 2003. A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias. *Bioinformatics.* 19:185–193.
- Breitfeld, D., L. Ohl, E. Kremmer, J. Ellwart, F. Sallusto, M. Lipp, and R. Förster. 2000. Follicular B helper T cells express CXC chemokine receptor 5, localize to B cell follicles, and support immunoglobulin production. *Journal of Experimental Medicine.* 192:1545–1552.
- Cheung, K.P., E. Yang, and A.W. Goldrath. 2009. Memory-like CD8+ T cells generated during homeostatic proliferation defer to antigen-experienced memory cells. *J. Immunol.* 183:3364–3372. doi:10.4049/jimmunol.0900641.
- Dai, M., P. Wang, A.D. Boyd, G. Kostov, B. Athey, E.G. Jones, W.E. Bunney, R.M. Myers, T.P. Speed, H. Akil, S.J. Watson, and F. Meng. 2005. Evolving gene/transcript definitions significantly alter the interpretation of GeneChip data. *Nucleic Acids Res.* 33:e175. doi:10.1093/nar/gni179.
- Diefenbach, A., A.M. Jamieson, S.D. Liu, N. Shastri, and D.H. Raulet. 2000. Ligands for the murine NKG2D receptor: expression by tumor cells and activation of NK cells and macrophages. *Nature Immunology.* 1:119–126. doi:10.1038/77793.
- Ernst, B. 1999. The Peptide Ligands Mediating Positive Selection in the Thymus Control T Cell Survival and Homeostatic Proliferation in the Periphery. *Immunity.* 1–9.
- Fulton, R.B., S.E. Hamilton, Y. Xing, J.A. Best, A.W. Goldrath, K.A. Hogquist, and S.C. Jameson. 2015. The TCR's sensitivity to self peptide-MHC dictates the ability of naive CD8(+) T cells to respond to foreign antigens. *Nature Publishing Group.* 16:107–117. doi:10.1038/ni.3043.
- Goldrath, A.W., and M.J. Bevan. 1999. Low-affinity ligands for the TCR drive proliferation of mature CD8+ T cells in lymphopenic hosts. *Immunity.* 11:183–190.
- Goldrath, A.W., C.J. Luckey, R. Park, C. Benoist, and D. Mathis. 2004. The molecular program induced in T cells undergoing homeostatic proliferation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 101:16885–16890. doi:10.1073/pnas.0407417101.
- Goldrath, A.W., L.Y. Bogatzki, and M.J. Bevan. 2000. Naive T cells transiently acquire a memory-like phenotype during homeostasis-driven proliferation. *Journal of Experimental Medicine.* 192:557–564.
- Goldrath, A.W., P.V. Sivakumar, M. Glaccum, M.K. Kennedy, M.J. Bevan, C. Benoist, D. Mathis, and E.A. Butz. 2002. Cytokine requirements for acute and Basal homeostatic proliferation of naive and memory CD8+ T cells. *Journal of Experimental Medicine.* 195:1515–1522. doi:10.1084/jem.20020033.
- Haluszczak, C., A.D. Akue, S.E. Hamilton, L.D.S. Johnson, L. Pujanauski, L. Teodorovic, S.C. Jameson, and R.M. Kedl. 2009. The antigen-specific CD8+ T cell repertoire in unimmunized mice includes memory phenotype cells bearing markers of homeostatic expansion. *J. Exp. Med.* 206:435–448. doi:10.1084/jem.20081829.
- Huber, W., A. von Heydebreck, H. Sülthmann, A. Poustka, and M. Vingron. 2002. Variance stabilization applied to microarray data calibration and to the quantification of differential expression. *Bioinformatics.* 18 Suppl 1:S96–104.
- Hugues, S., A. Scholer, A. Boissonnas, A. Nussbaum, C. Combadière, S. Amigorena, and L. Fetler. 2007. Dynamic imaging of chemokine-dependent CD8+ T cell help for CD8+ T cell responses. *Nature Immunology.* 8:921–930. doi:10.1038/ni1495.
- Irizarry, R.A., B.M. Bolstad, F. Collin, L.M. Cope, B. Hobbs, and T.P. Speed. 2003. Summaries of Affymetrix GeneChip probe level data. *Nucleic Acids Res.* 31:e15. doi:10.1093/nar/gng015.
- Jacomet, F., E. Cayssials, S. Basbous, A. Levescot, N. Piccirilli, D. Desmier, A. Robin, A. Barra, C. Giraud, F.

- Guilhot, L. Roy, A. Herbelin, and J.-M. Gombert. 2015. Evidence for eomesodermin-expressing innate-like CD8<sup>+</sup> kir/nkg2a<sup>+</sup> cells in human adults and cord blood samples. *Eur. J. Immunol.* n/a–n/a. doi:10.1002/eji.201545539.
- Jameson, S.C. 2002. MAINTAINING THE NORM: T-CELL HOMEOSTASIS. 1–10. doi:10.1038/nri853.
- Jameson, S.C., Y.J. Lee, and K.A. Hogquist. 2015. Innate memory T cells. *Adv. Immunol.* 126:173–213. doi:10.1016/bs.ai.2014.12.001.
- Kaeche, S.M., and W. Cui. 2012. Transcriptional control of effector and memory CD8<sup>+</sup> T cell differentiation. *Nature Publishing Group.* 12:749–761. doi:10.1038/nri3307.
- Kamimura, D., and M.J. Bevan. 2007. Naive CD8<sup>+</sup> T cells differentiate into protective memory-like cells after IL-2 anti IL-2 complex treatment in vivo. *Journal of Experimental Medicine.* 204:1803–1812. doi:10.1084/jem.20070543.
- Kastenmüller, W., M. Brandes, Z. Wang, J. Herz, J.G. Egen, and R.N. Germain. 2013. Peripheral prepositioning and local CXCL9 chemokine-mediated guidance orchestrate rapid memory CD8<sup>+</sup> T cell responses in the lymph node. *Immunity.* 38:502–513. doi:10.1016/j.immuni.2012.11.012.
- Kieper, W.C., and S.C. Jameson. 1999. Homeostatic expansion and phenotypic conversion of naïve T cells in response to self peptide/MHC ligands. *Proc Natl Acad Sci USA.* 96:13306–13311.
- Kieper, W.C., J.T. Burghardt, and C.D. Surh. 2004. A role for TCR affinity in regulating naïve T cell homeostasis. *The Journal of Immunology.* 172:40–44. doi:10.4049/jimmunol.172.1.40.
- Kim, H.-J., X. Wang, S. Radfar, T.J. Sproule, D.C. Roopenian, and H. Cantor. 2011. CD8<sup>+</sup> T regulatory cells express the Ly49 Class I MHC receptor and are defective in autoimmune prone B6-Yaa mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108:2010–2015. doi:10.1073/pnas.1018974108.
- King, C., A. Ilic, K. Koelsch, and N. Sarvetnick. 2004. Homeostatic expansion of T cells during immune insufficiency generates autoimmunity. *Cell.* 117:265–277. doi:10.1038/nri1377.
- Kurzweil, V., A. LaRoche, and P.M. Oliver. 2014. Increased Peripheral IL-4 Leads to an Expanded Virtual Memory CD8<sup>+</sup> Population. *The Journal of Immunology.* 192:5643–5651. doi:10.4049/jimmunol.1301755.
- Le Campion, A., C. Bourgeois, F. Lambolez, B. Martin, S. Léaument, N. Dautigny, C. Tanchot, C. Pénit, and B. Lucas. 2002. Naive T cells proliferate strongly in neonatal mice in response to self-peptide/self-MHC complexes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 99:4538–4543. doi:10.1073/pnas.062621699.
- Lee, A., S.P. Park, C.H. Park, B.H. Kang, S.H. Park, S.-J. Ha, and K.C. Jung. 2015. IL-4 Induced Innate CD8<sup>+</sup> T Cells Control Persistent Viral Infection. *PLoS Pathog.* 11:e1005193. doi:10.1371/journal.ppat.1005193.
- Lee, J.-Y., S.E. Hamilton, A.D. Akue, K.A. Hogquist, and S.C. Jameson. 2013a. Virtual memory CD8 T cells display unique functional properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110:13498–13503. doi:10.1073/pnas.1307572110.
- Lee, Y.J., K.L. Holzapfel, J. Zhu, S.C. Jameson, and K.A. Hogquist. 2013b. Steady-state production of IL-4 modulates immunity in mouse strains and is determined by lineage diversity of iNKT cells. *Nature Immunology.* 14:1146–1154. doi:10.1038/ni.2731.
- Lee, Y.J., S.C. Jameson, and K.A. Hogquist. 2011. Alternative memory in the CD8 T cell lineage. *Trends in Immunology.* 32:50–56. doi:10.1016/j.it.2010.12.004.
- Marçais, A., C.-A. Coupet, T. Walzer, M. Tomkowiak, R. Ghittoni, and J. Marvel. 2006. Cell-autonomous CCL5 transcription by memory CD8 T cells is regulated by IL-4. *The Journal of Immunology.* 177:4451–4457.
- Morris, S.C., S.M. Heidorn, D.R. Herbert, C. Perkins, D.A. Hildeman, M.V. Khodoun, and F.D. Finkelman. 2009. Endogenously produced IL-4 nonredundantly stimulates CD8<sup>+</sup> T cell proliferation. *J. Immunol.* 182:1429–1438. doi:10.4049/jimmunol.182.3.1429.
- Moutaftsi, M., B. Peters, V. Pasquetto, D.C. Tscharke, J. Sidney, H.-H. Bui, H. Grey, and A. Sette. 2006. A



- consensus epitope prediction approach identifies the breadth of murine TCD8<sup>+</sup>-cell responses to vaccinia virus. *Nature Biotechnology*. 24:817–819. doi:10.1038/nbt1215.
- Murali-Krishna, K., and R. Ahmed. 2000. Cutting edge: naive T cells masquerading as memory cells. *The Journal of Immunology*. 165:1733–1737. doi:10.4049/jimmunol.165.4.1733.
- Nourshargh, S., and R. Alon. 2014. Leukocyte migration into inflamed tissues. *Immunity*. 41:694–707. doi:10.1016/j.immuni.2014.10.008.
- Ortiz, B.D., A.M. Krensky, and P.J. Nelson. 1996. Kinetics of transcription factors regulating the RANTES chemokine gene reveal a developmental switch in nuclear events during T-lymphocyte maturation. *Molecular and cellular biology*. 16:202–210.
- Ortiz, B.D., P.J. Nelson, and A.M. Krensky. 1997. Switching gears during T-cell maturation: RANTES and late transcription. *Immunol. Today*. 18:468–471.
- Rahim, M.M.A., M.M. Tu, A.B. Mahmoud, A. Wight, E. Abou-Samra, P.D.A. Lima, and A.P. Makrigiannis. 2014. Ly49 receptors: innate and adaptive immune paradigms. *Front. Immunol.* 5:145. doi:10.3389/fimmu.2014.00145.
- Schaerli, P., K. Willmann, A.B. Lang, M. Lipp, P. Loetscher, and B. Moser. 2000. CXC chemokine receptor 5 expression defines follicular homing T cells with B cell helper function. *Journal of Experimental Medicine*. 192:1553–1562.
- Schüler, T., G.J. Hämmerling, and B. Arnold. 2004. Cutting edge: IL-7-dependent homeostatic proliferation of CD8<sup>+</sup> T cells in neonatal mice allows the generation of long-lived natural memory T cells. *The Journal of Immunology*. 172:15–19. doi:10.4049/jimmunol.172.1.15.
- Silver, J.D., M.E. Ritchie, and G.K. Smyth. 2009. Microarray background correction: maximum likelihood estimation for the normal-exponential convolution. *Biostatistics*. 10:352–363. doi:10.1093/biostatistics/kxn042.
- Slütter, B., L.L. Pewe, S.M. Kaech, and J.T. Harty. 2013. Lung airway-surveilling CXCR3(hi) memory CD8(+) T cells are critical for protection against influenza A virus. *Immunity*. 39:939–948. doi:10.1016/j.immuni.2013.09.013.
- Sosinowski, T., J.T. White, E.W. Cross, C. Haluszczak, P. Marrack, L. Gapin, and R.M. Kedl. 2013. CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> dendritic cell trans presentation of IL-15 to naive CD8<sup>+</sup> T cells produces antigen-inexperienced T cells in the periphery with memory phenotype and function. *J. Immunol.* 190:1936–1947. doi:10.4049/jimmunol.1203149.
- Soudja, S.M., A.L. Ruiz, J.C. Marie, and G. Lauvau. 2012. Inflammatory monocytes activate memory CD8(+) T and innate NK lymphocytes independent of cognate antigen during microbial pathogen invasion. *Immunity*. 37:549–562. doi:10.1016/j.immuni.2012.05.029.
- Sprent, J., and C.D. Surh. 2011. Normal T cell homeostasis: the conversion of naive cells into memory-phenotype cells. *Nature Publishing Group*. 131:478–484. doi:10.1038/ni.2018.
- Talloon, W., D.-A. Clevert, S. Hochreiter, D. Amaratunga, L. Bijns, S. Kass, and H.W.H. Göhlmann. 2007. I/NI-calls for the exclusion of non-informative genes: a highly effective filtering tool for microarray data. *Bioinformatics*. 23:2897–2902. doi:10.1093/bioinformatics/btm478.
- Veiga-Fernandes, H., U. Walter, C. Bourgeois, A. McLean, and B. Rocha. 2000. Response of naïve and memory CD8<sup>+</sup> T cells to antigen stimulation in vivo. *Nature Immunology*. 1:47–53. doi:10.1038/76907.
- Ventre, E., L. Brinza, S. Schicklin, J. Mafille, C.-A. Coupet, A. Marçais, S. Djebali, V. Jubin, T. Walzer, and J. Marvel. 2012. Negative regulation of NKG2D expression by IL-4 in memory CD8 T cells. *J. Immunol.* 189:3480–3489. doi:10.4049/jimmunol.1102954.
- Weinreich, M.A., O.A. Odumade, S.C. Jameson, and K.A. Hogquist. 2010. T cells expressing the transcription factor PLZF regulate the development of memory-like CD8<sup>+</sup> T cells. *Nature Publishing Group*. 11:709–716. doi:10.1038/ni.1898.

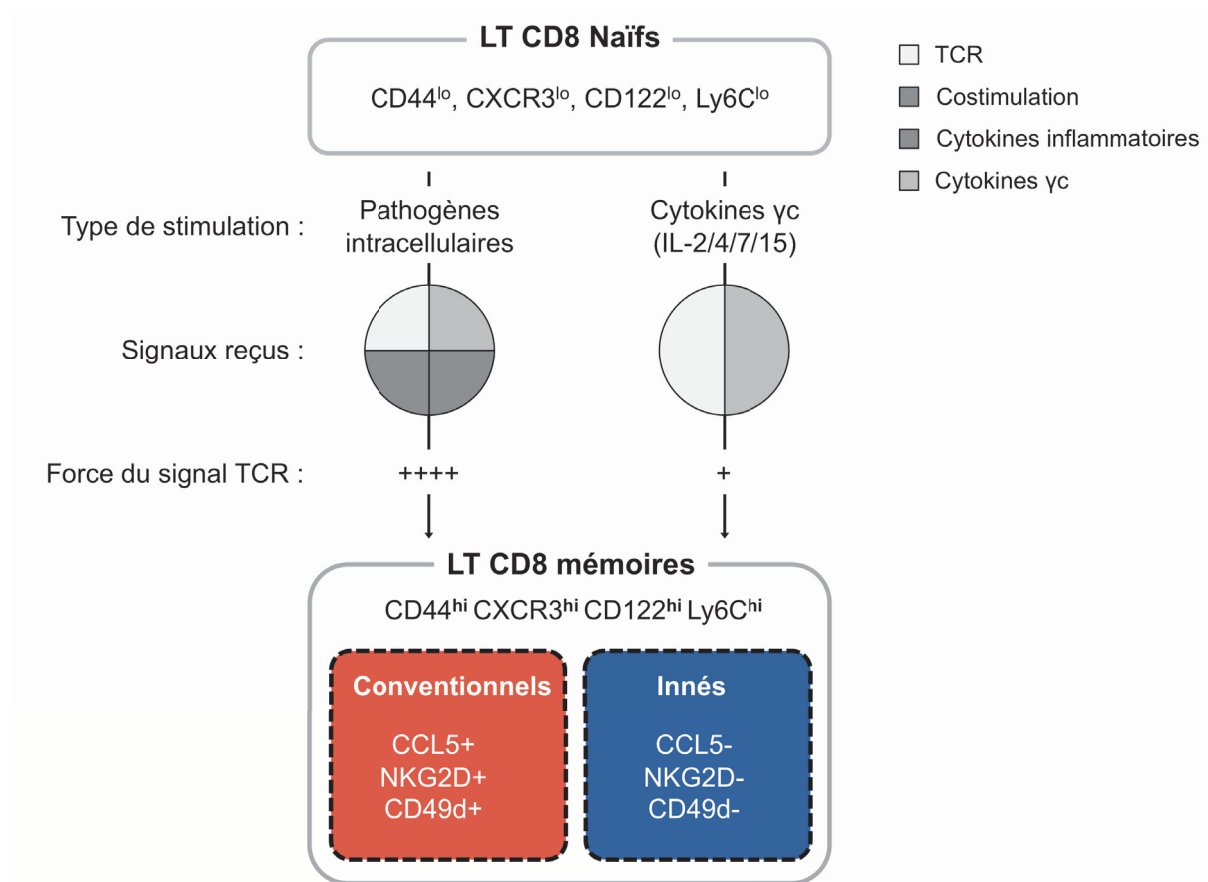


# Discussion

## **A. Identification des LT CD8 mémoires innés grâce à l'expression différentielle de CCL5 et NKG2D**

Dans cette étude, nous avons tout d'abord utilisé des modèles de LT CD8 transgéniques pour le TCR afin de générer expérimentalement des cellules mémoires innées. Ceci nous a permis de démontrer que les LT CD8 mémoires innés n'expriment ni la chimiokine CCL5 ni le récepteur activateur NKG2D. Jusqu'alors, seule l'étude de Haluszczak et collègues avait permis d'identifier un marqueur phénotypique exprimé différenciellement par ces deux classes de LT CD8 mémoires (Haluszczak et al., 2009). En effet, en utilisant le modèle OTI, ils génèrent des LT CD8 mémoires innés par LIP et démontrent que ces cellules n'expriment pas l'intégrine CD49d, contrairement à des LT CD8 mémoires OTI conventionnels.

Dans un contexte physiologique, nous démontrons que la très grande majorité des LT CD8 mémoires présents dans des souris naïves SPF n'expriment pas CCL5 et NKG2D. De même, Haluszczak et collègues démontrent que des LT CD8 de phénotype mémoire spécifiques des antigènes B8R, OVA et HSV, pour lesquels ces souris sont naïves, n'expriment pas l'intégrine CD49d. A l'inverse, suite à une infection par un pathogène, nous démontrons que la très grande majorité des LT CD8 mémoires générés sont de phénotype CCL5<sup>+</sup> NKG2D<sup>+</sup>. Ces différentes observations suggèrent que dans des conditions physiologiques, l'expression de CCL5, NKG2D et CD49d pourrait permettre de distinguer les LT CD8 mémoires conventionnels et innés au sein d'une population polyclonale (non TCR-transgénique). Afin de valider cette hypothèse, nous avons réalisé plusieurs tests fonctionnels permettant d'identifier dans quelle fraction du pool de cellules mémoires (CCL5<sup>+</sup> NKG2D<sup>+</sup> ou CCL5<sup>-</sup> NKG2D<sup>-</sup>) sont contenus les LT CD8 mémoires conventionnels. *In vitro*, nous démontrons que parmi des LT CD8 mémoires triés à partir de souris infectées avec VV, seules les cellules CCL5<sup>+</sup> NKG2D<sup>+</sup> sont capables de répondre à une restimulation avec l'antigène B8R (dérivé de VV). *In vivo*, nous démontrons que ces cellules sont également les seules à participer à une réponse secondaire contre le même pathogène, conférant ainsi une protection accrue à l'organisme. Il est important de mentionner que dans ces différentes expériences, l'absence de réactivité observée pour les cellules mémoires CCL5<sup>-</sup> NKG2D<sup>-</sup> n'est pas due à un défaut fonctionnel de ces cellules, puisqu'elles présentent une réactivité importante lors d'une stimulation de manière indépendante de la spécificité antigénique (PMA/ionomycine).



**Figure 13 : CCL5 et NKG2D sont deux biomarqueurs des LT CD8 mémoires conventionnels.**

Notre étude démontre que l'expression de CCL5 et NKG2D sépare le pool de cellules de phénotype mémoire en deux populations. Les LT CD8 mémoires conventionnels sont contenus dans la population  $CCL5^{+}$   $NKG2D^{+}$ . Ainsi, CCL5 et NKG2D constituent deux biomarqueurs des LT CD8 mémoires conventionnels. Ces biomarqueurs permettent pour la première fois de distinguer *in vivo* les populations de LT CD8 mémoires innés et conventionnels. Nous avons validé que l'intégrine CD49d est différemment exprimé par ces deux populations cellulaires.

Ainsi, ces différentes expériences permettent de démontrer que la population polyclonale de LT CD8 mémoires conventionnels, induite par reconnaissance d'antigènes dérivés de pathogènes, est contenue dans la fraction CCL5+ NKG2D+ du pool de LT CD8 mémoires. A l'inverse, la fraction CCL5- NKG2D- contient les LT CD8 mémoires innés générés dans un contexte physiologique non perturbé (**Figure 13**). CCL5 et NKG2D constituent donc deux biomarqueurs des LT CD8 mémoires conventionnels et permettent pour la première fois de les distinguer de leurs homologues innés dans des conditions physiologiques à l'échelle d'une population polyclonale. Il est tout de même important de préciser que notre étude ne permet pas d'exclure que certains LT CD8 mémoires innés soient contenus dans la fraction CCL5+ NKG2D+ du pool de cellules mémoires. La comparaison du transcriptome des LT CD8 mémoires NKG2D+ et NKG2D- nous a permis d'identifier que le gène *Itga4*, codant pour l'intégrine CD49d, est l'un des gènes les plus fortement exprimés par les LT CD8 mémoires NKG2D+. Nous avons validé cette expression différentielle de CD49d au niveau protéique. Ainsi, notre étude, associée à de précédentes données de la littérature, démontre que trois marqueurs phénotypiques (CCL5, NKG2D et CD49d) peuvent être utilisés pour discriminer les LT CD8 mémoires innés et conventionnels dans un contexte physiologique (**Figure 13**) (Haluszczak et al., 2009).

Il est intéressant de noter que dans des souris naïves SPF, nous observons un faible nombre de LT CD8 mémoires CCL5+ NKG2D+. Une observation similaire a été réalisée par Chiu et collègues concernant les LT CD8 mémoires CD49d+ (Chiu et al., 2013). L'existence de ces quelques cellules mémoires conventionnelles chez des animaux naïfs SPF peut être expliquée de plusieurs manières.

Tout d'abord, il est important de préciser que des souris naïves SPF sont en contact régulier avec différents antigènes exogènes, provenant de la nourriture, de la flore commensale mais également de certains pathogènes pour lesquels une surveillance n'est pas mise en place dans un contexte SPF. Cette stimulation antigénique régulière pourrait permettre la génération de LT CD8 mémoires conventionnels dans des animaux naïfs SPF. Nous avons comparé le nombre de LT CD8 mémoires CCL5+ et NKG2D+ dans des souris naïves SPF et germ free (résultats non montrés). Nous avons retrouvé un nombre similaire de ces cellules entre ces deux groupes de souris, suggérant que les antigènes provenant de la flore commensale ne sont pas nécessaires à la génération de ces cellules mémoires conventionnels dans ce contexte. Surh et collègues ont développé un modèle de souris antigen free (Jameson et al., 2015). Il serait particulièrement intéressant de tester l'existence de LT CD8 mémoires CCL5+ NKG2D+ dans ces animaux naïfs.

Le transcriptome de LT CD8 mémoires innés OTI générés expérimentalement par LIP a été analysé par Goldrath et collègues (Goldrath et al., 2004). De manière intéressante, ils démontrent que plus les LT CD8 OTI demeurent dans l'hôte lymphopénique, plus le transcriptome de ces cellules est proche de celui des LT CD8 mémoires OTI générés en réponse à une infection par Lm-OVA. Cette observation suggère que la différenciation complète des LT CD8 mémoires innés est un processus particulièrement long. Lors du transfert de LT CD8 mémoires NKG2D- dans des hôtes naïfs, nous n'avons jamais observé d'acquisition spontanée du marqueur NKG2D par ces cellules (c'est à dire sans infection de l'hôte par un pathogène). Néanmoins, il est important de noter que nous avons réalisé ces expériences sur de courtes périodes (de 7 à 10 jours). Il serait intéressant de déterminer si une telle conversion a lieu à plus long terme.

## **B. Caractérisation des LT CD8 mémoires innés**

- Etat de différenciation des LT CD8 mémoires innés

Jusqu'à présent, les LT CD8 mémoires innés étaient définis par l'expression de marqueurs phénotypiques classiquement utilisés pour distinguer les cellules mémoires des cellules naïves (CD44, CXCR3, ...). Une question légitime à l'encontre de ces cellules est de savoir si elles correspondent à de vraies cellules mémoires ou simplement à des cellules naïves « déguisées » en cellules mémoires via l'expression de certains marqueurs. Certaines études ont commencé à répondre à cette question en montrant que certaines fonctions des LT CD8 mémoires innés sont améliorées comparé aux LT CD8 naïfs (Lee et al., 2013a; Haluszczak et al., 2009). En utilisant l'expression différentielle de NKG2D, nous avons trié à partir de souris immunisées les LT CD8 mémoires conventionnels et innés et avons comparé leur transcriptome. Cette analyse nous a permis de mettre en évidence que les LT CD8 mémoires innés possèdent un transcriptome très différent des LT CD8 naïfs. En revanche, le transcriptome de ces cellules est comparable à celui de LT CD8 mémoires conventionnels. Ainsi, du point de vue transcriptomique, les LT CD8 mémoires innés sont proches des LT CD8 mémoires conventionnels.

Cependant, l'analyse de nos données de microarray a également permis de mettre en évidence que les LT CD8 mémoires innés sont moins différenciés que les LT CD8 mémoires conventionnels. En effet, les LT CD8 mémoires conventionnels expriment plus fortement un faible nombre de gènes caractéristiques de cellules plus différenciées. A l'inverse, très peu de gènes sont plus fortement exprimés par LT CD8 mémoires innés. Ceci démontre que ces



cellules ne constituent pas un lignage CD8 à part entière, mais plutôt un intermédiaire de différenciation entre des cellules naïves et des cellules mémoires conventionnelles. Comme nous l'avons vu en introduction, certains couples de facteur de transcription régulent la différenciation des LT CD8. Le niveau d'expression de chaque membre d'un couple reflète généralement le niveau de différenciation d'un LT CD8 activé (Kaech and Cui, 2012). Des membres antagonistes de certains de ces couples de facteurs de transcription présentent des niveaux d'expressions opposés dans les LT CD8 mémoires innés et conventionnels. De manière intéressante, les LT CD8 mémoires conventionnels expriment systématiquement le membre impliqué dans la différenciation plus importante des LT CD8 (Tbet, ID2, Zeb2, Blimp1), tandis que les LT CD8 mémoires innés expriment plus fortement le membre favorisant une différenciation moindre des LT CD8 (Eomes, ID3). Ainsi, le pattern d'expression de facteur de transcription observé dans ces deux classes de LT CD8 mémoires est en accord avec leurs états de différenciation distincts.

Les LT CD8 mémoires conventionnels expriment également plus fortement certains gènes codant pour des molécules cytotoxiques (Gzma/B/K, FasL et perforine). Cette caractéristique typique des cellules plus différenciées suggère que les LT CD8 mémoires conventionnels élimineraient plus rapidement des cellules cibles par cytotoxicité. Néanmoins, il serait intéressant de réaliser un test de cytotoxicité redirigé pour comparer cette propriété entre les deux classes de LT CD8 mémoires.

Enfin, les LT CD8 mémoires conventionnels expriment plus fortement des gènes codant pour des récepteurs de cellules NK, notamment NKG2A. L'expression différentielle de NKG2A a par ailleurs été validée au niveau protéique (résultats non montrés). Chez la souris, le gène *Klrc1* codant pour le récepteur NKG2A fait partie d'un locus du chromosome 6 appelé complexe NK. Ce complexe est composé de plusieurs gènes codant pour différents récepteurs NK, notamment NKG2D (Raulet, 2003). Contrairement à NKG2D, le récepteur NKG2A forme un hétérodimère avec la molécule CD94 et possède une queue intra-cytoplasmique comportant deux motifs ITIM (Immuno receptor Tyr-based inhibitory motif), conférant à ce récepteur une fonction inhibitrice. Le ligand connu de NKG2A est la molécule de CMH-I non conventionnel Qa-1<sup>b</sup> liée au peptide Qdm provenant de la séquence signal de CMH-I conventionnels (Vance et al., 1998). Ainsi, l'engagement de NKG2A par son ligand conduit à la délivrance d'un signal inhibiteur dans la cellule NK l'empêchant de lyser la cellule cible. Il est ainsi intéressant de noter que les LT CD8 mémoires conventionnels expriment à la fois des récepteurs NK activateurs et inhibiteurs. La lyse d'une cellule cible par une cellule NK dépend de l'équilibre entre signaux activateurs et inhibiteurs reçu par cette cellule. Certaines études ont démontré que l'engagement de NKG2D à la surface des LT CD8 permet d'induire directement la lyse de cellules cibles (Talebian et al., 2014; Sckisel et al., 2013; Chu et al.,

2013; Crosby et al., 2014). Il serait donc intéressant d'étudier si l'équilibre entre les signaux reçus via NKG2D et via NKG2A régule également dans les LT CD8 mémoires l'élimination de cellules infectées ou tumorales.

- Répertoire TCR des LT CD8 mémoires innés

Le répertoire TCR des LT CD8 mémoires innés est mal connu. En effet, seules deux études utilisant des systèmes d'enrichissement par tétramère ont permis de démontrer qu'une très faible fréquence de ces cellules est spécifique de différents antigènes dérivés de pathogènes (Haluszczak et al., 2009; Akue et al., 2012). Néanmoins, ces méthodes d'échantillonnage ne permettent pas de déterminer la diversité du répertoire TCR d'une population cellulaire. Dans notre étude, nous avons comparé le répertoire TCR des deux populations de LT CD8 mémoires à celui des LT CD8 naïfs. Pour cela, les recombinaisons VβJβ présentent au sein de chaque population ont été détectées par PCR multiplex. Nous avons ainsi pu observer que la population de LT CD8 mémoires innés possède un répertoire TCR au moins aussi diversifié que celui de la population de LT CD8 naïfs. A l'inverse, la population de LT CD8 mémoires conventionnels possède un répertoire TCR plus restreint comparé à ces deux populations cellulaires, reflétant le processus de sélection clonale.

En utilisant ces données de répertoire TCR, nous avons également réalisé une analyse en composante principale. Cette analyse nous a permis de comparer les différentes populations de LT CD8 en fonction de la composition en réarrangements VβJβ de leur répertoire TCR. Cette analyse montre que malgré un niveau de diversité similaire, les répertoires TCR des LT CD8 naïfs et mémoires innés ne sont sans doute pas identiques. Ceci suggère que tous les antigènes reconnus par les LT CD8 naïfs ne le sont pas forcément par les LT CD8 mémoires innés, et inversement. Comme nous l'avons vu en introduction, plusieurs études ont démontré que comparativement aux LT CD8 naïfs CD5<sup>lo</sup>, les LT CD8 naïfs CD5<sup>hi</sup> prolifèrent et se différencient en LT CD8 mémoires plus efficacement dans des conditions lymphopéniques. Le mécanisme de LIP étant particulièrement important pour la génération des LT CD8 mémoires innés, cette observation suggère que cette population cellulaire pourrait être formée majoritairement à partir de précurseurs naïfs CD5<sup>hi</sup>, expliquant potentiellement la différence de composition du répertoire TCR des LT CD8 naïfs et mémoires innés. Néanmoins, aucune étude à ce jour n'a comparé le répertoire TCR des LT CD8 naïfs CD5<sup>lo</sup> et CD5<sup>hi</sup>.

- Déficit d'accès rapide au tissu pulmonaire en condition inflammatoire

Des gènes codant pour des molécules impliquées dans la migration cellulaire font partie des gènes dont l'expression est diminuée dans les LT CD8 mémoires innés comparé aux LT CD8 mémoires conventionnels. En particulier, nous avons démontré au niveau protéique que certaines chaînes  $\alpha$  (CD49a (*Itga1*), CD49d (*Itga4*)) et une chaîne  $\beta$  (CD29 (*Itgb1*)) d'intégrines sont plus fortement exprimées par les LT CD8 mémoires conventionnels. En utilisant un modèle d'inflammation pulmonaire, nous avons pu mettre en évidence que les LT CD8 mémoires innés présentent un défaut d'accès rapide au parenchyme pulmonaire ainsi qu'aux voies aériennes. Ainsi, bien que ces deux populations cellulaires soient présentes en quantité équivalente dans le système sanguin irrigant les tissus périphériques, seuls les LT CD8 mémoires conventionnels sont capables de traverser rapidement les endothéliums des vaisseaux sanguins pour accéder au tissu pulmonaire en condition inflammatoire.

L'extravasation des lymphocytes depuis les vaisseaux sanguins dépend de l'expression par ces cellules de ligands de sélectines, d'intégrines et de récepteurs de chimiokines. CXCR3 et CCR5 sont deux récepteurs de chimiokines impliqués dans la migration des LT CD8 au sein des tissus périphériques. Par exemple, l'application de chimiokines CXCL9/10/11 au niveau des voies aériennes ou des muqueuses vaginales suffit à induire le recrutement de LT CD8 effecteurs au niveau de ces tissus périphériques, de manière dépendante de l'expression de CXCR3 (Campanella et al., 2008; Shin and Iwasaki, 2012). Certaines de ces chimiokines, notamment CXCL10, sont produites au niveau des voies aériennes lors de l'injection de poly I/C par voie intranasale (McNally et al., 2012). Nous n'avons observé aucune différence d'expression de CXCR3 entre les LT CD8 mémoires innés et conventionnels. De même, un test de transwell nous a permis de démontrer que ces deux populations cellulaires présentent une capacité de migration équivalente en réponse à la chimiokine CXCL10. L'ensemble de ces données suggère que l'expression de CXCR3 est nécessaire mais pas suffisante pour permettre le recrutement rapide des LT CD8 au niveau des tissus périphériques. Il serait intéressant de confirmer ceci en comparant dans notre modèle d'inflammation pulmonaire le recrutement de LT CD8 mémoires innés et conventionnels CXCR3 KO.

Les intégrines sont importantes pour permettre aux cellules immunitaires de traverser le tissu endothélial des vaisseaux sanguins et ainsi accéder aux tissus périphériques (Ley et al., 2007). En particulier, plusieurs études démontrent que l'intégrine VLA1 (composée des chaînes CD49a et CD29) favorise l'accès, la rétention et la survie des LT au niveau des voies aériennes pulmonaires (Ray et al., 2004; Chapman and Topham, 2010; Sandoval et al., 2013; Richter and Topham, 2007). Dans notre modèle d'inflammation pulmonaire, l'administration d'un anticorps bloquant anti-CD49a permettrait de déterminer si la différence d'accès au tissu pulmonaire observée entre les deux populations de cellules mémoires est effectivement liée à l'expression différentielle de cette intégrine.

L'accès des LT à de nombreux tissus périphériques est régulé par l'expression d'intégrines. En effet, en condition inflammatoire, de nombreux ligands d'intégrines sont exprimés par les endothéliums des vaisseaux sanguins. Plusieurs études démontrent que dans un contexte infectieux, l'expression de l'intégrine VLA4 (composée des chaînes CD49d et CD29) par les LT leur permet l'accès au tissu cérébral ainsi qu'à la muqueuse vaginale (Sa et al., 2014; Young et al., 2011; Schenkel, 2014). Notre étude démontre que les LT CD8 mémoires innés ne possèdent pas tous les outils moléculaires nécessaires à l'entrée dans les tissus périphériques. Il serait néanmoins intéressant de valider que cette faible expression de certaines intégrines par les LT CD8 mémoires innés ralentit également leur accès à d'autres tissus périphériques.

L'une des clés de l'efficacité des réponses T CD8 mémoires est la capacité de ces cellules à accéder aux tissus périphériques. L'autorisation d'accès aux tissus périphériques n'est délivrée qu'à une faible proportion de LT CD8, au moment de leur activation par reconnaissance des antigènes dérivés du pathogène. Ce processus sélectif, conduisant à l'activation et à la différenciation des cellules T spécifiques de l'antigène, impliquerait également un contrôle par les lymphocytes T régulateurs empêchant la sélection des clones de faible affinité pour l'antigène. A l'inverse, de part leur mode de génération alternatif, les LT CD8 mémoires innés ne subissent pas de sélection clonale et ne reçoivent pas cette autorisation à accéder aux tissus périphériques. Deux hypothèses peuvent être proposées pour expliquer ce phénomène.

Tout d'abord, on peut imaginer que permettre aux LT CD8 mémoires innés d'accéder aux tissus périphériques serait potentiellement dangereux pour l'organisme. Une étude démontre que le modèle de souris diabétiques NOD présente une lymphopénie marquée, favorisant la prolifération homéostatique des LT auto-agressifs qui acquièrent alors des fonctions cytotoxiques. Ce phénomène participe activement au développement de cette pathologie auto-immune (King et al., 2004). Comme nous l'avons vu précédemment, il est probable que la population de LT CD8 mémoires innés soit préférentiellement générée à partir de précurseurs naïfs CD5<sup>hi</sup>. L'étude de Fulton et collègues démontre de manière convaincante que les LT CD8 naïfs CD5<sup>hi</sup> sont plus réactifs vis à vis de complexes CMH-I/antigène du soi comparé à leurs homologues CD5<sup>lo</sup> (Fulton et al., 2015). De plus dans notre étude, nous démontrons que la population de LT CD8 mémoires innés possède un répertoire TCR diversifié et que ces cellules possèdent une réactivité augmentée comparée aux LT CD8 naïfs. L'ensemble de ces caractéristiques suggère que cette population cellulaire serait davantage sujette à réagir contre des antigènes du soi. Ainsi, on peut imaginer que l'expression des intégrines VLA1 et VLA4

par cette population cellulaire augmenterait de manière conséquente le risque de développement de pathologies auto-immunes.

Le rôle clé des intégrines dans le contrôle de l'accès aux tissus et dans le développement de pathologie auto-immune est illustré dans la sclérose en plaque. La sclérose en plaque est une pathologie auto-immune du système nerveux central causée par l'infiltration de cellules immunitaires dans le cerveau. L'infiltration de LT CD8 potentiellement auto-agressifs au niveau du cerveau jouerait un rôle important dans le développement de cette pathologie (Salou et al., 2015). Parmi les traitements développés pour traiter cette pathologie, on trouve le Tysabri® (Natalizumab), qui est un anticorps neutralisant dirigé contre la chaîne d'intégrine  $\alpha 4$  (CD49d) (Polman et al., 2006). Ce traitement, qui a pour effet de bloquer l'infiltration de cellules immunitaires au niveau du cerveau, conduit à une diminution importante des poussées inflammatoires chez les patients traités. Néanmoins, l'un des effets secondaires majeurs du Tysabri® est le développement de leucoencéphalopathies multifocales progressives, dues à une infection virale opportuniste. Ainsi, on peut imaginer que l'absence d'expression de ces intégrines par les LT CD8 mémoires innés représenterait un mécanisme de prévention développé par le système immunitaire pour réduire les risques de développement de pathologies auto-immunes.

Alternativement, l'accès des LT CD8 mémoires innés aux tissus périphériques n'est peut être pas nécessaire pour la fonction de ces cellules. On peut en effet imaginer que ces cellules joueraient un rôle crucial au niveau des organes lymphoïdes secondaires (voir paragraphes suivants sur la localisation et fonction des LT CD8 mémoires innés).

- Localisation particulière des LT CD8 mémoires innés ?

Parmi les rares gènes plus fortement exprimés par les LT CD8 mémoires innés, nous avons identifié le gène codant pour le récepteur de chimiokine CXCR5. CXCR5 est le récepteur de la chimiokine CXCL13 qui est abondamment produite au niveau des follicules B. Ainsi, l'expression de CXCR5 par les LT CD4 follicular helper favorise la localisation de ces cellules au sein des follicules B, leur permettant ainsi d'exercer leur fonction de soutien aux LB (Breitfeld et al., 2000; Schaerli et al., 2000). Cheung et collègues ont également identifié une expression de *Cxcr5* augmentée dans des LT CD8 mémoires innés OTI générés par LIP (Cheung et al., 2009). De plus, dans un contexte infectieux, ils démontrent que la localisation de ces cellules au sein de la rate diffère de celle de LT CD8 mémoires OTI conventionnels. En effet, alors que les cellules mémoires conventionnelles sont rapidement relocalisées au niveau de la zone marginale et de la pulpe rouge, les LT CD8 mémoires innés demeurent dans la pulpe blanche, notamment au niveau du manchon lymphoïde péri-artériel (PALS,

Periarteriolar Lymph Sheath) mais également au niveau des follicules B. Dans un premier temps, il serait judicieux de vérifier au niveau protéique que dans des conditions physiologiques, les LT CD8 mémoires innés expriment plus fortement le récepteur CXCR5. Dans un second temps, il serait particulièrement intéressant de comparer la localisation des LT CD8 mémoires innés et conventionnels au sein d'organes lymphoïdes secondaires en condition homéostatique ainsi qu'en contexte infectieux. Une localisation différente des LT CD8 mémoires innés, par exemple au niveau des follicules B, permettrait de mieux caractériser le rôle de ces cellules. Ces expériences sont en cours de réalisation en collaboration avec le Dr Wolfgang Kastenmüller (Institute of Experimental Immunology, Université de Bonn, Allemagne).

- Rôle des LT CD8 mémoires innés dans les réponses immunitaires primaires

La diversité du répertoire TCR des LT CD8 mémoires innés associée à la génération précoce de ces cellules suggère que ces cellules pourraient participer à des réponses immunitaires primaires contre différents pathogènes. Afin de valider cette hypothèse, nous avons co-transféré des LT CD8 naïfs et mémoires innés dans des souris hôtes par la suite immunisées avec VV ou Lm. Nos résultats démontrent que lors d'infections par ces deux pathogènes, les LT CD8 mémoires innés sont capables de générer des LT CD8 effecteurs NKG2D+, confirmant la participation de ces cellules à des réponses immunitaires primaires. Nous avons observé que les LT CD8 naïfs et mémoires innés contribuent de manière équivalente à la génération du pool de LT CD8 effecteurs NKG2D+ lors d'une infection par VV. A l'inverse, environ 80% des LT CD8 effecteurs NKG2D+ générés lors d'une infection par Lm provient de la population de LT CD8 mémoires innés. Cette contribution supérieure des LT CD8 mémoires innés à une réponse contre Lm pourrait s'expliquer de plusieurs manières :

1/ Une proportion plus élevée de clones spécifiques de Lm dans la population de LT CD8 mémoires innés. Une méthode d'enrichissement par tétramères chargés avec des antigènes de Lm permettrait d'analyser la fréquence de clones spécifiques de ces antigènes.

2/ Une réactivité augmentée de ces cellules vis à vis de l'antigène. Cet effet a été documenté par Haluszczak et collègues. Ils démontrent que comparativement à des LT CD8 naïfs de même spécificité antigénique, des LT CD8 mémoires innés spécifiques de l'antigène B8R prolifèrent davantage après reconnaissance de cet antigène (Haluszczak et al., 2009). Lee et collègues réalisent une observation similaire (Lee et al., 2013a). Dans cette étude, les auteurs co-transfèrent dans des souris hôtes un nombre équivalent de LT CD8 naïfs et mémoires innés



spécifiques de l'antigène OVA et les hôtes sont par la suite immunisés par Lm-OVA. Bien que les deux populations cellulaires transférées produisent une réponse immunitaire contre cet agent pathogène, un nombre plus important de LT CD8 mémoires innés est observé dans la rate durant la phase précoce de la réponse immunitaire (jusqu'à J8 post-infection). Ainsi, la plus grande réactivité des LT CD8 mémoires innés leur permettrait de générer proportionnellement un nombre de LT CD8 effecteurs plus important lors de réponses immunitaires primaires contre différents pathogènes.

3/ Une plus grande sensibilité de ces cellules aux signaux inflammatoires, notamment l'IL-12. Comme nous l'avons vu en introduction, les infections par Lm sont connues pour générer un environnement inflammatoire riche en IL-12. Nos résultats démontrent que les LT CD8 mémoires innés sont plus sensibles à cette cytokine (combinée avec IL-18 et IL-2) comparés aux LT CD8 naïfs. Ainsi, cette sensibilité accrue à ce signal 3 pourrait favoriser une amplitude plus importante de la réponse immunitaire générée par ces cellules.

Plusieurs hypothèses peuvent être émises quand au rôle des LT CD8 mémoires innés dans le système immunitaire et plus particulièrement dans la réponse primaire.

Premièrement, on peut imaginer que la réactivité augmentée des LT CD8 mémoires innées pourrait permettre une élimination plus rapide et plus efficace de l'agent pathogène, notamment via une génération plus rapide de LT CD8 effecteurs. Cette hypothèse est notamment supportée par l'étude de Lee et collègues (Lee et al., 2013a). En effet, ils démontrent que 5 jours après infection par Lm-OVA, une très faible quantité de bactéries est retrouvée dans la rate et le foie de souris ayant reçu des LT CD8 mémoires innés spécifiques de l'antigène OVA. A l'inverse, une quantité beaucoup plus importante de bactéries est observée chez des souris ayant reçu des LT CD8 naïfs de même spécificité antigénique.

Deuxièmement, on peut imaginer que la participation des LT CD8 mémoires innés aux réponses immunitaires primaires pourrait avoir un impact sur la réponse des LT CD8 naïfs.

Par exemple, les LT CD8 mémoires innés pourraient amplifier la réponse des LT CD8 naïfs. Un tel phénomène de help CD8 a notamment été décrit par Hugues et collègues (Hugues et al., 2007). En effet, leur étude démontre qu'un premier contact entre un LT CD8 et une DC, dépendant de la reconnaissance spécifique d'un antigène, favorise par la suite le recrutement d'autres LT CD8 au contact de cette DC, de manière dépendant de CCR5. De manière intéressante, ce phénomène de help CD8 permet d'augmenter une réponse T CD8 contre un deuxième antigène.

Enfin, il est également possible que la réponse des LT CD8 mémoires innés ait un rôle régulateur sur la réponse des LT CD8 naïfs. Cette régulation pourrait avoir lieu de manière directe, via une fonction régulatrice des LT CD8 mémoires innés, ou indirecte, via une



compétition pour l'antigène. Néanmoins, nos différentes expériences n'ont pas permis d'identifier de gènes ou molécules associées à des fonctions régulatrices au sein de ces cellules.

En conclusion, l'identification du rôle exact de ces cellules nécessiterait de pouvoir mesurer la réponse contre un agent pathogène de souris WT ou dépourvues de ces cellules. Par exemple, Lee et collègues démontrent que des souris BALB/c déficientes en iNKT (CD1d KO) contrôlent moins efficacement une infection par LCMV clone 13 comparées à des souris WT (Lee et al., 2015). L'absence de iNKT conduit à une diminution de la production d'IL-4 et donc indirectement à une diminution du nombre de LT CD8 mémoires innés spécifiques d'antigènes dérivés de ce pathogène. Néanmoins, cette étude documente uniquement l'impact des LT CD8 mémoires innés générés via l'IL-4.

### **C. LT CD8 mémoires innés chez l'homme**

Contrairement aux souris de laboratoire maintenues en conditions d'hébergement SPF, l'homme est quotidiennement soumis à un très grand nombre d'antigènes. En conséquence, il est particulièrement difficile de déterminer par quelle voie (conventionnelle ou innée) chaque LT CD8 mémoires a été généré. Néanmoins, l'analyse de certains tissus à des périodes précoces du développement, durant lesquelles on pense que l'organisme n'a pas encore été en contact avec un grand nombre d'antigènes, a permis de fournir certains indices en faveur de l'existence de LT CD8 mémoires innés. En effet, Min et collègues rapportent dans leur étude l'existence de LT CD8 de phénotype mémoire (Eomes+) dans la rate et le thymus de fœtus humains (18 à 24 semaines de gestation) (Min et al., 2011). L'environnement fœtal étant considéré comme relativement protégé de la rencontre avec différents antigènes, ces cellules pourraient être des LT CD8 mémoires innés. Plus récemment, Jacomet et collègues ont identifiés des LT CD8 de phénotype mémoire qui pourraient correspondre à des cellules mémoires innés (Jacomet et al., 2015a). Ces cellules expriment des récepteurs NK (KIR et NKG2A) ainsi qu'un niveau élevé d'Eomes et sont retrouvées, en très faible proportion, dans des échantillons de sang de cordon. Chez l'adulte, un marqueur phénotypique permettant de distinguer les LT CD8 mémoires innés et conventionnels serait particulièrement utile pour identifier les cellules mémoires innées. Basé sur les résultats que nous avons obtenus chez la souris, nous avons étudié l'expression de CCL5 par le pool de LT CD8 mémoires présents dans le sang circulant chez l'homme. De manière similaire aux observations faites chez la souris, nos résultats montrent que l'expression de CCL5 permet de séparer le pool de LT CD8

mémoires humains en deux sous-populations cellulaires. De plus, l'utilisation de tétramères pour identifier des LT CD8 mémoires humains conventionnels générés contre des antigènes dérivés des virus Influenza et CMV nous a permis de démontrer que la majorité de ces cellules est contenue dans la fraction CCL5+ du pool de cellules mémoires. Ainsi, l'expression de CCL5 pourrait être utilisée chez l'homme pour distinguer les LT CD8 mémoires conventionnels (CCL5+) des LT CD8 mémoires innés (CCL5-). Néanmoins, une analyse en détail des LT CD8 mémoires CCL5- serait nécessaire pour caractériser le mode de génération de ces cellules. De même, une telle analyse permettrait d'identifier l'impact potentiel des LT CD8 mémoires innés chez l'homme dans des contextes physiologiques et pathologiques. Une telle étude nécessiterait néanmoins l'identification d'un marqueur de substitution pour identifier les LT CD8 mémoires innés. En effet, l'étude de l'expression de CCL5 nécessite une étape de fixation et de perméabilisation cellulaire due à la localisation intracellulaire de cette protéine. Dès lors, la réalisation de tests fonctionnels est compromise. Ce marqueur de substitution devra donc être exprimé au niveau de la membrane plasmique et présenter un pattern d'expression similaire à celui de CCL5 dans les LT CD8. Basé sur notre étude et sur la littérature, un candidat potentiel serait la chaîne d'intégrine  $\alpha 4$  (CD49d).

Nous avons démontré chez la souris que CCL5 est un biomarqueur des LT CD8 mémoires conventionnels induits par antigène. L'utilisation de ce biomarqueur pourrait ainsi permettre d'identifier de manière globale les LT CD8 mémoires conventionnels au sein du pool de cellules de phénotype mémoire, indépendamment de la spécificité antigénique de ces cellules. En effet à l'heure actuelle, le suivi des réponses immunitaires T CD8 nécessite l'utilisation de tétramère chargés avec des antigènes dérivés de pathogènes. Cette méthode ne permet d'étudier qu'un nombre restreint de LT CD8 spécifiques du pathogène. L'utilisation du biomarqueur CCL5 pourrait ainsi être utilisé pour mesurer rapidement l'efficacité de certains protocoles de vaccination dans des modèles précliniques SPF. De manière alternative, le biomarqueur CCL5 pourrait également être utilisé pour évaluer rapidement la qualité des cellules CD8 mémoires générées par un protocole de vaccination.

Un certain nombre de contextes physiologiques et pathologiques pourraient favoriser la génération de LT CD8 mémoires innés chez l'homme. Le vieillissement est un processus naturel ayant pour conséquence une diminution du pool de LT CD8 naïfs tout en augmentant la taille du pool de LT CD8 de phénotype mémoire (Nikolich-Zugich, 2008). La diminution de la population LT CD8 naïfs observée chez les personnes âgées corrèle avec l'état lymphopénique et une augmentation de la prolifération homéostatique (Sauce et al., 2012). Ceci suggère que chez des individus âgés, l'augmentation de la prolifération homéostatique induite par lymphopénie pourrait permettre la génération de LT CD8 mémoires innés. Ce

phénomène est par ailleurs observé chez la souris (Chiu et al., 2013; Renkema et al., 2013). De manière intéressante, les personnes âgées sont caractérisées par des réponses immunitaires T CD8 plus faibles, notamment à cause d'une diminution de la diversité du répertoire TCR. Cette observation est contradictoire avec nos résultats montrant que la population de LT CD8 mémoires innés chez la souris possède un répertoire TCR diversifié. Ainsi, il serait intéressant d'évaluer la proportion de LT CD8 mémoires CCL5- chez des personnes âgées et d'étudier la diversité du répertoire TCR de ces cellules.

Un important contexte lymphopénique est également créé par les traitements myeloablatifs et lymphoablatifs (chimiothérapies et radiothérapies) utilisés notamment pour traiter certains cancers. De même, les patients infectés par le HIV présentent une importante lymphopénie due notamment à l'élimination des LT CD4. On peut aisément supposer que cet environnement lymphopénique favorise une importante prolifération homéostatique des lymphocytes T, conduisant ainsi potentiellement à la génération de LT CD8 mémoires innés. En accord avec cette hypothèse, Sauce et collègues démontrent une corrélation positive entre le titre viral et le pourcentage de LT CD8 naïfs proliférant (KI67+) chez des patients infectés par le HIV non traités par des antirétroviraux. Chez ces mêmes patients, l'augmentation du pourcentage de LT CD8 naïfs en prolifération corrèle avec une diminution du pourcentage de LT CD8 naïfs totaux (Sauce et al., 2012). Ainsi, il serait intéressant d'examiner la proportion de LT CD8 mémoires CCL5- dans les différents contextes précédemment cités et de déterminer l'impact de ces cellules sur ces contextes pathologiques.

#### **D. Signaux régulant l'expression de CCL5 et NKG2D et certaines intégrines**

L'expression différentielle de CCL5, NKG2D et de certaines intégrines entre LT CD8 mémoires conventionnels et innés soulève une interrogation quant aux signaux régulant l'expression des gènes codant pour ces protéines.

Comme nous l'avons vu en introduction, la génération des LT CD8 mémoires conventionnels repose sur l'intégration de trois signaux distincts : le signal TCR, le signal de costimulation et le signal cytokines pro-inflammatoires, appelés respectivement signal 1, 2 et 3. La prolifération des cellules activées est ensuite augmentée par les cytokines de la famille  $\gamma$ c telles que l'IL-2 (**Figure 12**). A l'inverse, la génération des LT CD8 mémoires innés ne nécessite l'intégration que de deux signaux (signal cytokines  $\gamma$ c et signal TCR) (**Figure 12**). Deux études indépendantes démontrent que le signal de costimulation CD28 n'est pas nécessaire pour la génération de LT CD8 mémoires innés par LIP {Ch (Cho et al., 2000; PRLIC et al., 2001) a nécessité du signal 3 pour la génération de ces cellules mémoires innées

n'a pas réellement été étudiée. Seule une étude démontre qu'un signal IL-12 permet d'augmenter la prolifération homéostatique des LT CD8 naïfs en conditions lymphopéniques (Kieper et al., 2001). Ces observations suggèrent qu'une différence majeure dans le mode de génération de ces deux classes de cellules mémoires serait l'absence ou la très faible intégration de signaux 2 et 3 par les cellules mémoires innées. Il serait ainsi intéressant de déterminer si le déficit d'expression de CCL5, NKG2D et de certaines intégrines par les LT CD8 mémoires innés est dû à l'absence d'intégration de ces signaux. Par exemple, le signal de costimulation CD28 permet d'augmenter la production de CCL5 par des LT humains stimulés avec PMA (Sotsios et al., 2000). De même, le signal de costimulation CD43 permet d'augmenter très fortement la production de CCL5 par des IEL (Intra-epithelial Lymphocyte) de l'intestin stimulés avec un anticorps anti-CD3 (Montufar-Solis et al., 2005).

L'expression du gène *Ccl5* est sous contrôle de plusieurs facteurs de transcription. En effet, l'analyse du promoteur de ce gène révèle l'existence d'un grand nombre de sites de fixation pour différents facteurs de transcription, en particulier NF- $\kappa$ B, NFAT, AP-1, TCF1 et KLF13. De même, un site consensus de fixation d'éléments de réponse à CD28 a été identifié au sein de ce promoteur (Nelson et al., 1993; Song et al., 2000; Nelson et al., 1996; Moriuchi et al., 1997). De manière intéressante, la mutation d'un des 4 sites de fixation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B conduit à une diminution très importante de l'activité du promoteur *Ccl5*, démontrant l'importance de ce facteur de transcription dans l'induction de l'expression du gène *Ccl5* (Moriuchi et al., 1997). *Ccl5* est exprimé dans les LT seulement 3 à 5 jours après activation de ces cellules via leur TCR. Cette expression tardive de *Ccl5* contraste fortement avec l'activation précoce de NF- $\kappa$ B en réponse à une stimulation forte du TCR, suggérant l'existence de facteurs de transcription tardifs impliqués dans la transcription de ce gène dans les LT mémoires. Song et collègues ont identifié le facteur de transcription KLF13 comme élément majeur régulant la transcription de *Ccl5* dans les LT (Song et al., 1999). Chez l'homme, la protéine KLF13 est détectée dans les LT seulement 3 à 5 jours après stimulation du TCR, tandis que l'ARNm de KLF13 est détecté immédiatement après activation. Ce pattern d'expression particulier s'explique par la régulation post-traductionnelle de KLF13 qui subit une ubiquitination et une dégradation par le protéasome. La levée de cette régulation post-traductionnelle 3 à 5 jours après activation du TCR permet l'accumulation de la protéine KLF13 permettant d'induire la transcription tardive de *Ccl5* (Kim et al., 2012). Ahn et collègues démontrent que KLF13 agit comme une véritable plate-forme d'induction de la transcription de *Ccl5* (Ahn et al., 2007). En outre, la fixation de ce facteur de transcription permet le recrutement de certains co-activateurs de la transcription tels que les histones acétyl transférases p300/CBP et PCAF. L'acétylation des histones favorise alors un remodelage de

la chromatine dépendant de l'ATP, favorisant l'accès de la machinerie de transcription au promoteur *Ccl5*. De plus, KLF13 et NF-κB agissent en synergie pour permettre la transcription de *Ccl5*, suggérant que la fixation tardive de KLF13 favorise l'activité NF-κB au niveau de ce promoteur (Song et al., 2002).

Dans nos données de transcriptomique, *Klf13* n'apparaît pas comme étant différentiellement exprimé entre les LT CD8 mémoires innés et conventionnels. Il serait néanmoins intéressant de comparer le niveau de protéine KLF13 entre ces deux populations de LT CD8 mémoires afin d'identifier si la différence d'expression de CCL5 observée est due à une différence d'expression de KLF13.

La régulation de la transcription du gène *Klrk1* (codant pour NKG2D) est mal connue. Seule une étude récente démontre dans les cellules NK que l'activation de STAT3 via l'IL-21 permet d'augmenter l'expression de NKG2D (Zhu et al., 2014). Néanmoins, en absence de STAT3, un niveau basal d'expression de NKG2D est malgré tout détecté, suggérant que d'autres facteurs de transcription sont également impliqués dans l'expression de ce gène. Une analyse du promoteur du gène *Klrk1* permettrait d'identifier des séquences consensus de fixation de certains facteurs de transcription.

Sasaki et collègues démontrent que l'IL-4 diminue l'expression de l'intégrine CD49d sur des LT CD8 (Sasaki et al., 2008). Ainsi, il est particulièrement intéressant de noter que les LT CD8 mémoires innés présentent un déficit d'expression de trois gènes régulés de manière similaire par l'IL-4. Ceci suggère que les gènes *Ccl5*, *Klrk1* et *Itga4* présentent des éléments de régulation communs, qui restent à déterminer.

En conclusion, plusieurs phénomènes cumulatifs pourraient expliquer le déficit d'expression de ces différents gènes par les LT CD8 mémoires innés. Il est possible que l'absence de certains signaux (2 et 3) ne permette pas l'expression optimale de ces gènes par ces cellules mémoires. De plus, certaines cytokines γc (notamment l'IL-4) nécessaires à la génération de ces cellules mémoires pourraient agir sous forme de rétrocontrôle négatif sur l'expression de ces gènes.

## **E. Rôle de la production de CCL5 par les LT CD8 mémoires**

Bien que le rôle de l'expression de NKG2D par les LT CD8 soit largement documenté, le rôle de la production de la chimiokine CCL5 par ces cellules demeure mal compris. Le gène *Ccl5* est l'un des trois gènes les plus fortement exprimés par les LT CD8 mémoires conventionnels comparativement aux LT CD8 naïfs. De plus, les LT CD8

mémoires conventionnels expriment constitutivement le gène *Ccl5* conduisant à la présence dans ces cellules quiescentes d'un stock d'ARNm *Ccl5* associé à un stock protéique localisé dans des granules de sécrétion (Marçais et al., 2006b; Catalfamo et al., 2004). Cette caractéristique unique permet aux LT CD8 mémoires conventionnels de sécréter très rapidement cette chimiokine après engagement de leur TCR (Walzer et al., 2003). Cette sécrétion rapide suggère un rôle essentiel de la production de cette chimiokine par les LT CD8 mémoires. En utilisant un modèle de souris F5 déficientes pour le gène *Ccl5*, nous avons tenté d'identifier le rôle de la sécrétion de cette chimiokine par les LT CD8 mémoires. L'ensemble des expériences réalisées ne montre aucune différence entre des LT CD8 mémoires WT et *Ccl5* KO, que ce soit sur le plan de la réponse immunitaire générée par ces cellules, ou de leur localisation anatomique ou au sein d'un même organe lymphoïde. Une conclusion similaire fut tirée de l'étude de Crawford et collègues (Crawford et al., 2011). Nous avons également comparé le transcriptome de LT CD8 mémoires WT et *Ccl5* KO en condition homéostatique et restimulé 2h avec le peptide NP68. Dans l'une ou l'autre des conditions, nous n'avons observé aucun gène différentiellement exprimé entre ces deux populations de cellules mémoires. Un tel résultat suggère que la sécrétion de CCL5 par les LT CD8 mémoires ne modifie pas, à court terme, le transcriptome de ces cellules. A l'inverse, en utilisant un modèle de CTL (Cytotoxic T Lymphocytes) de la lignée Heu171 incubés avec les cellules tumorales dont ils sont spécifiques, Franciszkiewicz et collègues démontrent que l'engagement de CCR5 à la surface de CTL permet d'induire l'expression de CXCR4, augmentant ainsi leur migration induite par la chimiokine CXCL12 (Franciszkiewicz et al., 2014).

Une étude récente de Lim et collègues démontre que lors d'une infection par le virus Influenza, les neutrophiles recrutés au site de l'infection (voies aériennes pulmonaires) sécrètent la chimiokine CXCL12 tout au long de leur parcours (Lim et al., 2015). Des expériences *in vitro* démontrent que les LT CD8 utilisent ce gradient de CXCL12 pour migrer vers les zones enrichies en neutrophiles. Les neutrophiles étant les premières cellules immunitaires recrutées sur le lieu de l'infection, ces résultats suggèrent que ces cellules, via la sécrétion de CXCL12, tracent une véritable route vers le lieu de l'infection, empruntée par la suite par d'autres cellules immunitaires, notamment les LT CD8. Un tel phénomène pourrait également se produire avec les LT CD8 mémoires via la sécrétion de CCL5. En effet, nous avons observé qu'une faible stimulation des LT CD8 mémoires conventionnels F5 via un agoniste partiel (NP3R) ou des cytokines pro-inflammatoires (comme l'IL-12 et l'IL-18) suffit à déclencher la sécrétion de CCL5 par ces cellules. Ainsi, il serait intéressant d'étudier si dans un contexte infectieux, le recrutement tissulaire de LT CD8 mémoires conventionnel favorise le recrutement d'autres cellules immunitaires via la sécrétion de CCL5.



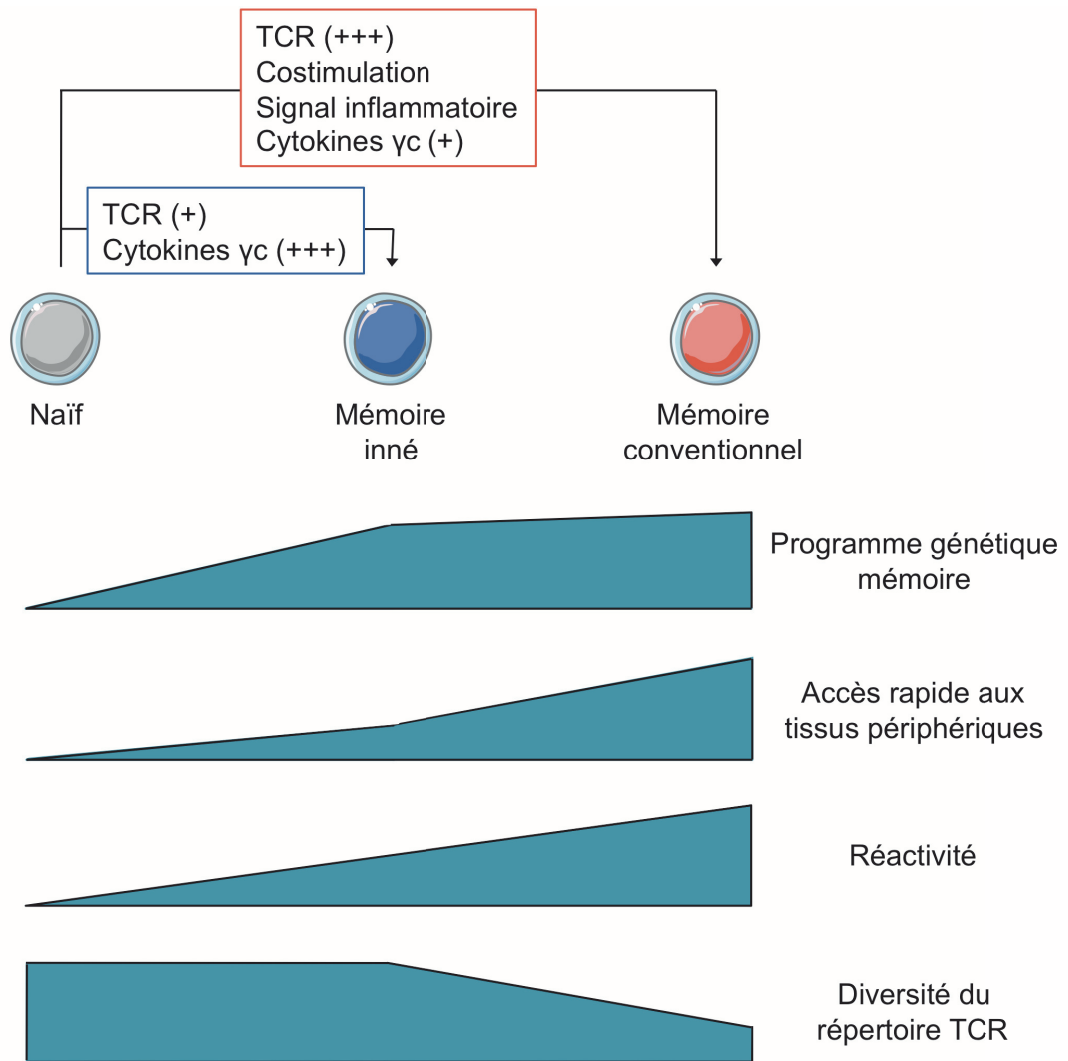
Enfin, il est important de mentionner qu'une redondance existe entre les différentes chimiokines produites par les cellules immunitaires (Proudfoot, 2002). Par exemple, le récepteur majoritaire de la chimiokine CCL5 (CCR5) est également capable de lier les chimiokines CCL3 et CCL4. De même, CCL5 est également reconnu par les récepteurs CCR1 et CCR5. Ainsi, cette importante redondance explique probablement pourquoi l'utilisation d'un modèle KO simple pour CCL5 ne permet pas d'identifier un rôle de la chimiokine CCL5 lorsqu'elle est produite par les LT CD8 mémoires.

## Conclusion générale

Durant cette étude, nous avons identifié des biomarqueurs permettant pour la première fois de distinguer dans des conditions physiologiques des populations de LT CD8 mémoires polyclonales générées via différents mécanismes. Les LT CD8 mémoires innés, générés via d'intenses stimulations par des cytokines  $\gamma c$ , n'expriment pas la chimiokine CCL5 et le récepteur NKG2D. A l'inverse, les LT CD8 mémoires conventionnels, générés par reconnaissance d'antigènes dérivés de pathogènes, expriment ces deux protéines. Chez l'homme, nous démontrons qu'il est également possible de distinguer les LT CD8 mémoires innés et conventionnels grâce à l'expression de CCL5. Ainsi cette étude a permis d'identifier des outils qui pourront être utilisés pour caractériser les LT CD8 mémoires innés chez l'homme.

L'utilisation du biomarqueur NKG2D nous a permis de caractériser la population de LT CD8 mémoires innés chez la souris. Nous démontrons ainsi que ces cellules présentent des caractéristiques typiques de vraies cellules mémoires, telle qu'une réactivité augmentée ainsi qu'un programme génétique caractéristique de cellules mémoires. Ces cellules sont cependant moins différenciées que les LT CD8 mémoires conventionnels (**Figure 14**). Nous avons également pu mettre en évidence que la population de LT CD8 mémoires innés conserve également des caractéristiques typiques de LT CD8 naïfs. En effet, cette population cellulaire possède un répertoire TCR diversifié, favorisant la participation de ces cellules à des réponses immunitaires contre différents pathogènes (**Figure 14**). De plus, tout comme des cellules naïves, ces cellules ne possèdent pas la capacité à pénétrer rapidement dans les tissus périphériques en conditions inflammatoires (**Figure 14**). Ainsi, l'ensemble de nos résultats démontre que cette population cellulaire hybride est à la frontière entre LT CD8 naïfs et LT CD8 mémoires conventionnels.





**Figure 14 : Les LT CD8 mémoires innés sont à la frontière entre cellules naïves et cellules mémoires conventionnelles.**

# Annexes



# Regulation of mouse NK cell development and function by cytokines

**Antoine Marçais<sup>1,2,3,4,5</sup>, Sébastien Viel<sup>1,2,3,4,5,6</sup>, Morgan Grau<sup>1,2,3,4,5</sup>, Thomas Henry<sup>1,2,3,4,5</sup>,  
Jacqueline Marvel<sup>1,2,3,4,5</sup> and Thierry Walzer<sup>1,2,3,4,5</sup>\***

<sup>1</sup> CIRI, International Center for Infectiology Research, Université de Lyon, Lyon, France

<sup>2</sup> U1111, INSERM, Lyon, France

<sup>3</sup> Ecole Normale Supérieure de Lyon, Lyon, France

<sup>4</sup> Centre International de Recherche en Infectiologie, Université Lyon 1, Lyon, France

<sup>5</sup> UMR5308, CNRS, Lyon, France

<sup>6</sup> Laboratoire d'Immunologie, Hospices Civils de Lyon, Centre Hospitalier Lyon Sud, Lyon, France

## Edited by:

Aurore Saudemont, University  
College London, UK

## Reviewed by:

Marc Dalod, Centre National de la  
Recherche Scientifique, France  
Sebastian Carotta, Walter & Eliza Hall  
Institute of Medical Research,  
Australia

## \*Correspondence:

Thierry Walzer, U1111, Centre  
International de Recherche en  
Infectiologie (CIRI), INSERM – CNRS  
UMR5308, Université Lyon 1, ENS de  
Lyon, 21 Avenue Tony Garnier – 69365  
Lyon Cedex 07, France  
e-mail: thierry.walzer@inserm.fr

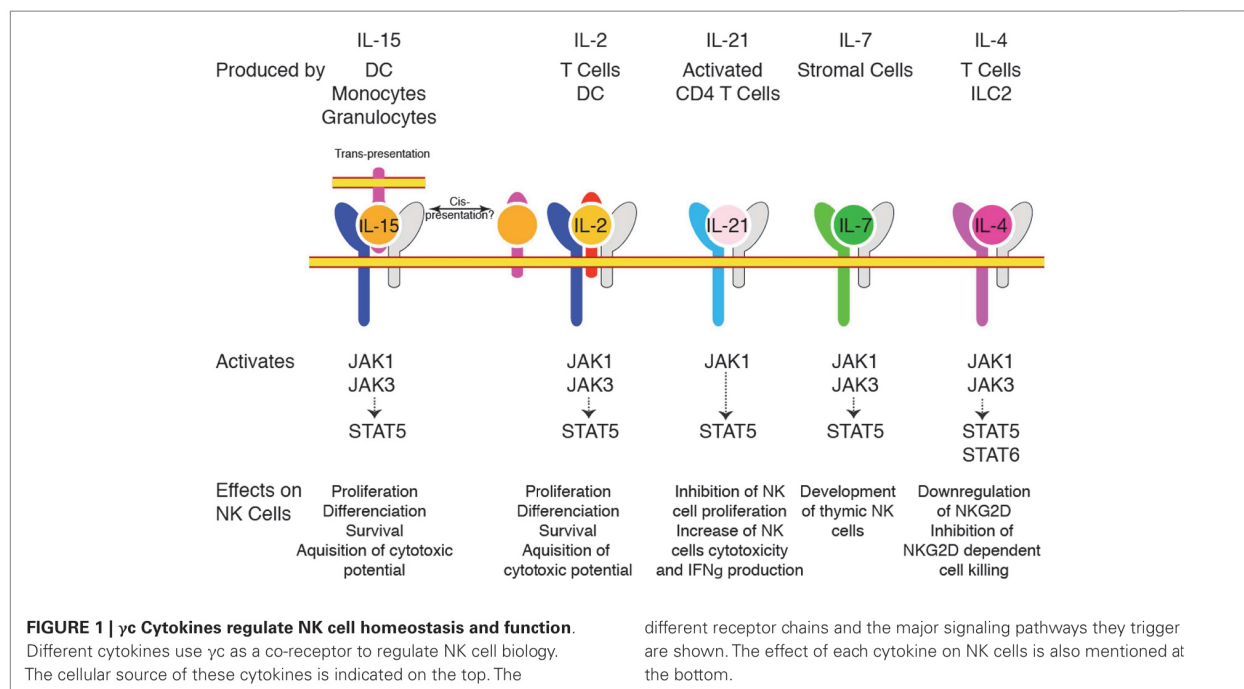
Natural Killer (NK) cells are innate lymphocytes with an important role in the early defense against intracellular pathogens and against tumors. Like other immune cells, almost every aspects of their biology are regulated by cytokines. Interleukin (IL)-15 is pivotal for their development, homeostasis, and activation. Moreover, numerous other activating or inhibitory cytokines such as IL-2, IL-4, IL-7, IL-10, IL-12, IL-18, IL-21, Transforming growth factor- $\beta$  (TGF $\beta$ ) and type I interferons regulate their activation and their effector functions at different stages of the immune response. In this review we summarize the current understanding on the effect of these different cytokines on NK cell development, homeostasis, and functions during steady-state or upon infection by different pathogens. We try to delineate the cellular sources of these cytokines, the intracellular pathways they trigger and the transcription factors they regulate. We describe the known synergies or antagonisms between different cytokines and highlight outstanding questions in this field of investigation. Finally, we discuss how a better knowledge of cytokine action on NK cells could help improve strategies to manipulate NK cells in different clinical situations.

**Keywords: natural killer cells, cytotoxicity, interferons, signal transduction, interleukin-15, interleukin-12, interleukin-18, TGF-beta**

Natural killer (NK) cells are Innate Lymphoid Cells (ILC) involved in the immuno-surveillance of cancers and in the early control of infections by intracellular pathogens (1). They can kill cells recognized as targets through a battery of surface receptors (2) and produce large amounts of IFN- $\gamma$  upon activation (1). Recently, the growing ILC family has been reclassified into three groups according to the pattern of cytokine they secrete. In this classification, NK cells are part of the group 1 ILC subset (3). In mice, NK cells mainly develop in the bone marrow (BM) (4, 5). If the earliest committed NK cell progenitor (pre-pro NK) does not express CD122 (6) which is the  $\beta$  subunit of the IL-2/IL-15 receptor, expression of this molecule is acquired soon after at the NK precursor (NKP) stage (7). The expression of this receptor is thereafter conserved and is a hallmark of the NK cell population. This underlines the fact that the various aspects of NK cell development, homeostasis, and function are conditioned by IL-15. If this cytokine is fundamental, a variety of other cytokines have been shown to influence the behavior of NK cells, alone or in synergy. In this review, we aim to describe the complex interplay between the molecular pathways triggered by these cytokines. We restricted our field of investigation to the direct effects of cytokines on NK cells. We believe that a good understanding of these pathways is essential to the rational design of drugs targeting the various aspects of NK cell functions.

## THE $\gamma$ c FAMILY OF CYTOKINES

The central role of cytokines sharing the  $\gamma$ c subunit as a co-receptor (IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15, and IL-21) in the constitution of the NK cell pool was appreciated some 20 years ago. Indeed, X-linked severe combined immunodeficiency patients presenting mutations leading to loss of  $\gamma$ c function (8) and mice with targeted  $\gamma$ c deletion (9) both presented a quasi absence of NK cells indicating that these cells relied on one or more of these cytokines. Absence of mature NK cells in mice genetically deficient in IL-2/15R $\beta$  chain restricted the list of candidates to IL-2 and IL-15 (10). Finally, genetic ablation of IL-15 (11) or IL-15R $\alpha$  (12), leading to a very similar phenotype with a near complete absence of mature NK cells, formally demonstrated the paramount importance of this cytokine for the generation of NK cells. In contrast, mice deficient for IL-2, IL-4, and IL-7 had normal NK cell numbers under homeostatic conditions (13). Importantly and despite expression of IL-2/15R $\beta$ , NKPs appeared to be independent of  $\gamma$ c signaling since they were present in normal numbers in  $\gamma$ c deficient animals, suggesting that IL-15 only becomes important for subsequent maturation steps (13). Other  $\gamma$ c cytokines are also involved in NK cell homeostasis and activation as summarized in Figure 1.



## IL-15

### DISCOVERY/RECEPTORS/TRANS-PRESENTATION

IL-15 was discovered as a result of its “IL-2-like” stimulatory activity since it was able to support proliferation of IL-2 dependent cell lines (14, 15). Structurally, IL-15 is a 14–15 kDa protein presenting sparse sequence similarity (19%) but extensive 3-dimensional analogy with IL-2 and belonging to the same four  $\alpha$ -helix bundle cytokine family (15). IL-15 and IL-2 both interact with receptor complexes containing the common gamma chain ( $\gamma_c$ ) (16) and IL-2/15R $\beta$  chain (15, 17). The  $\gamma_c$  subunit also takes part in the formation of the receptors for IL-4, IL-7, IL-9, and IL-21 (18) whereas IL-2/15R $\beta$  is only used for signaling by IL-2 and IL-15. IL-2 and IL-15 receptors only differ by their  $\alpha$  chain, IL-2R $\alpha$  (CD25) being dedicated to IL-2 and IL-15R $\alpha$  to IL-15 (19). In contrast to IL-2R $\alpha$ , IL-15R $\alpha$  alone displays a high affinity of binding for IL-15 ( $1.4 \times 10^{-11}$  M), equivalent to that of the heterotrimeric IL-2R for IL-2 (19). This last property is fundamental to understand the physiology of IL-15. Indeed, this high affinity, coupled to the fact that IL-15 and IL-15R $\alpha$  are co-expressed by the same cells, allows intracellular binding of IL-15 to IL-15R $\alpha$  in the endoplasmic reticulum. The complex is then shuttled to the cell membrane and presented to activate neighboring cells expressing IL-2/15R $\beta$ / $\gamma_c$ . This mechanism was called trans-presentation (20, 21) and proposed to explain the counter-intuitive fact that expression of IL-15R $\alpha$  was not needed on responding NK cells to maintain their homeostasis, as would have been expected for a classical cytokine response scheme, but on neighboring cells (22–26). We can hypothesize that such a mechanism allows a very precise delivery of the cytokine stimulus perhaps coupled to other stimulating molecules. As NK cells rely on IL-15 for different purposes, trans-presentation would confine IL-15 signal to selective niches

where it would sustain needs of specific NK cell sub-populations. Moreover, systemic availability of this cytokine could be detrimental as exemplified by the development of fatal leukemia in IL-15 transgenic animals (27, 28). The debate whether cis-presentation (i.e., autocrine presentation of IL-15) also occurs was recently revived by a paper showing that following bacterial challenge, NK cells produce and present IL-15 in a time frame and quantities matching DCs and that this cis-presentation was as important as DC trans-presentation to elicit NK cell IFN- $\gamma$  production (29).

### ROLE

The key role of IL-15 in NK cell biology is underlined by the complete absence of these cells in mice deficient in components of the IL-15 signaling axis (11, 12). However, the role of IL-15 in NK cell physiology is not limited to development. Indeed, this cytokine controls as well survival of mature NK cells in the periphery (24, 25, 30, 31), an effect that is probably mediated by up-regulation of anti-apoptotic Bcl2 family members and down regulation of apoptotic ones (31, 32). Moreover, resting NK cells are poor effectors and need to be primed beforehand to express their full effector capacity. This priming step is also controlled by IL-15, presented by dendritic cells, or monocytes (33–38). Mechanistically, IL-15 signals NK cells to constitute stocks of the effector proteins Gzmb and Perforin, absent from unprimed NK cells (33). IL-15, synergizing with IL-12, is also mandatory for IFN- $\gamma$  expression by NK cells (29, 34, 35). Finally, IL-15 controls NK cell homeostatic proliferation (25, 36, 39) as well as proliferation induced following bacterial, viral, or fungal infections (21, 35, 40, 41). How IL-15 can mediate such a wide range of effects, some homeostatic (differentiation, survival), and some context-dependent (priming, IFN- $\gamma$  secretion) is still unresolved. One possibility would be that



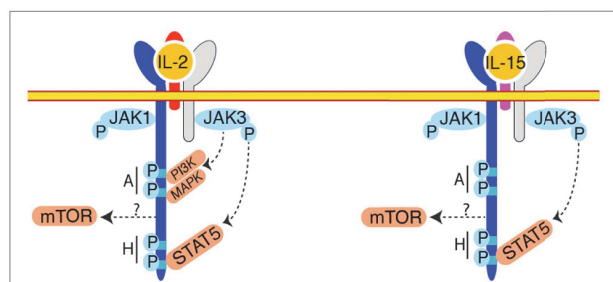
varying IL-15 concentration triggers different responses on NK cells. In line with this idea, decreasing  $\gamma c$  expression levels results in reduction of the peripheral NK cell pool (42, 43). This suggests that maximal expression of this receptor and hence maximal signal transduction is necessary for optimal transduction of the IL-15 signal. A recent study tested this model *in vivo* using mouse strains deficient for IL-15R $\alpha$  or bearing chimeric IL-15R $\alpha$  either as transgene or knocked in the IL-15R $\alpha$  locus (44). This strategy allowed the authors to study NK cell populations exposed to five different levels of IL-15 trans-presentation (from null to normal levels). This disclosed the fact that on one hand, constituting a normal peripheral NK cell pool, relying on high proliferation rate in the BM, requires a high level of IL-15 trans-presentation. On the other hand, maturation is much less demanding. The impact of these different levels of IL-15 on the different signaling pathways downstream of the IL-15R has not been analyzed.

## REGULATION

How is IL-15 regulated at the basal state remains largely unknown. IRF1, a transcription factor involved in type I IFN (IFN I)-induced IL-15 production, probably plays a role in this process. Indeed, expression of this factor is necessary on hematopoietic as well as non-hematopoietic cells for NK cell generation (45). IL-15 mRNA is expressed *in vivo* by a number of tissues and cell types, from hematopoietic (radiosensitive in chimera experiments) and non-hematopoietic origin (radio-resistant) (24, 46, 47). Chimera experiments have suggested that IL-15 trans-presentation by cells of the hematopoietic system is the most efficient since limiting IL-15R $\alpha$  expression to the hematopoietic system is sufficient to generate normal NK cell numbers in the BM and only slightly decreased numbers in the periphery (26, 39). In line with its dual function in NK cell homeostasis and activation, IL-15 is expressed at low level under homeostatic conditions in monocytes/macrophages but this expression can be considerably enhanced by several pro-inflammatory agents like LPS (48), poly(I:C), or IFN I (49). More recently, using a transgenic mouse line in which emerald GFP (EmGFP) is expressed under the control of endogenous *Il15* regulatory elements, Lefrançois and collaborators have tracked the cell subsets expressing IL-15 mRNA under homeostatic or inflammatory conditions (50, 51). They confirmed the expression of this cytokine mRNA by a broad distribution of myeloid cells including monocytes, neutrophils, eosinophils, mast cells, and dendritic cells, the strongest expression being observed in basophils. More surprisingly, they described high transcription of IL-15 by Hematopoietic Stem Cells (HSC) and its progressive down regulation during T cell differentiation (51). The significance of this last result awaits further confirmation and functional tests. In addition, IL-15 expression is regulated at several steps including the post-transcriptional level. How much of this regulation is conserved in this reporter remains to be tested. It is however worth noting that these results perfectly correlate with the transcriptomic data available at the Immgen Consortium website ([www.immgen.org](http://www.immgen.org)) for the cell types analyzed (52).

## SIGNALING

In terms of signaling, most of our knowledge was generated by studies focused on the IL-2-IL-2 receptor interaction (Figure 2).



**FIGURE 2 | Signaling downstream IL-2/IL-15R $\beta$ .** Upon engagement of IL-2 or IL-15 different tyrosine residues are phosphorylated in the IL-2/15R $\beta$  intracytoplasmic regions, across two main regions ("A" and "H"). These phosphorylations lead to the recruitment and downstream phosphorylation of STAT5 by JAK1 and JAK3. The mTOR pathway takes also part to IL-15 signaling but the mode of mTOR activation is currently unknown. Activation of mTOR is essential to increase NK cell metabolism. PI3K and MAPK are also activated upon IL-2 engagement and probably also upon IL-15 engagement but this requires formal demonstration.

Given the shared receptor and the similarity of effect of IL-2 and IL-15 on cultured cells, it was inferred that IL-15 stimulation would lead to activation of the same pathways. And indeed, most of the experiments conducted so far suggested a remarkable conservation. However, these two cytokines are not functionally redundant as exemplified by the divergent immunological outcomes of IL-2 or IL-15 treatment (53). A recent *in vitro* study aiming at understanding these differences evidenced subtle changes in the gene transcription induced in CD8 T cells stimulated with IL-2 or IL-15 (54). This observation opens up the possibility that some differences exist in the signaling pathways downstream of the IL-2 or IL-15 receptors. In this context, the exact contribution of the different signaling pathways during NK cell development and activation is poorly understood. Upon IL-2 binding to its receptor, signaling is triggered by Janus Kinases (Jak) 1 and 3, bound to IL-15R $\beta$  and  $\gamma c$  (55–58). These kinases phosphorylate tyrosine residues of IL-15R $\beta$ , which serve as docking sites for phosphotyrosine binding proteins such as the Shc adapter protein, Insulin Receptor Substrate (IRS) proteins, and STAT5a and b transcription factors and lead to the activation of three main transduction pathways: the Jak-STAT pathway, the phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/Akt pathway, and the Mitogen Activated Protein Kinase (MAPK) pathway. Given its very proximal role in signal transduction, deficiency in Jak3 results in the absence of NK cells (59). In an attempt to dissect the importance of the different pathways stemming from the IL-2/15R $\beta$  subunit, complementation of *Il2/15rβ<sup>-/-</sup>* mice with IL-2/15R $\beta$  transgenes deleted for different cytoplasmic domains was undertaken (60). This approach demonstrated the necessity of the membrane distal H-region (Figure 2) containing tyrosine 392 and 510 and known to recruit STAT3 and 5 and potentially the p85 subunit of PI3K for the generation of a normal NK cell pool (60, 61). In contrast, the truncated protein generated after deletion of the membrane proximal A-region, known to interact with Lck, the p85 subunit of PI3K and Shc, was able to perfectly complement the IL-2/15R $\beta$  deficient mice and to restore NK cell homeostasis and functional response to IL-15 and

seems thus dispensable. The importance of the STAT5 pathway was confirmed by several studies (62, 63). Indeed, NK cell number was reduced in STAT5b and to a lesser extent in STAT5a deficient animals and this was associated with a decreased response to IL-2 and IL-15 (63). NK cell specific deletion of both STAT5 factors lead to the complete disappearance of this population resulting from survival defects, probably associated with a block of differentiation at the NKP stage (62). In accordance with the putative role of the H-region of IL-2/15R $\beta$  to recruit p85 via phosphorylated Y392 is a series of studies dissecting the role of the PI3K pathway in NK cell development and functions (64–66). Class IA PI3Ks comprise a p110 catalytic subunit associated with a p85, p55, or p50 regulatory subunit. The p110 catalytic subunits are encoded by three genes *Pik3ca*, *Pik3cb*, and *Pik3cd*. Class IB PI3Ks consist of the catalytic subunit p110 $\gamma$  (encoded by the *Pik3cg*) associated with the regulatory subunits p101 or p84. NK cells express all catalytic p110 (66), however only the role of p110 $\gamma$  and  $\delta$  were examined using mice deficient for these proteins (65, 66) or bearing a catalytically inactive form of p110 $\delta$  (64). Defect in p110 $\gamma$  or  $\delta$  signaling lead to a decrease in peripheral NK cell number (64–66), combined defect in p110 $\gamma/\delta$  prevented terminal NK cell maturation (66). Moreover, defect in PI3K signaling lead to impaired proliferative (64–66) and cytotoxic (64, 66) responses to IL-2. Importantly, PI3K signaling can be triggered by diverse stimuli including cytokines other than IL-2 or IL-15 (67) chemokines (68) and NK activating receptors (69). The phenotype described in the PI3K deficient NK cells can thus be the consequence of the impairment of responses to other stimuli and not only IL-15. Moreover, direct activation of PI3K by IL-15 was not assessed in these studies neither *in vitro* nor *in vivo* leaving the question of a direct effect unanswered. The generation of phosphatidylinositol triphosphate by PI3K recruits a vast number of targets to the plasma membrane and leads to their activation. However, the downstream targets important for NK cell differentiation and activation have not been investigated. We recently discovered that the kinase mechanistic Target Of Rapamycin (mTOR), which can be activated downstream of PI3K, is a key signaling node activated by IL-15 and responsible for NK cell maturation and activation by pro-inflammatory signals (Marçais et al. manuscript in preparation). mTOR is an evolutionarily conserved serine/threonine kinase integrating various extracellular cues: metabolite and growth factors but also antigenic and inflammatory signals as recently described for T cells (70). mTOR takes part in two complexes: mTORC1 and mTORC2 differing by their constituting members and the targets they phosphorylate. We followed phosphorylation of key mTOR targets by flow cytometry and showed that mTOR activity is developmentally regulated with a progressive shut down upon differentiation and BM egress. In contrast, mTOR activity is strongly induced when NK cells are exposed to pro-inflammatory signals triggered by poly(I:C) injection. Of note, mTOR activation necessitated high IL-15 concentrations; instead, STAT5 phosphorylation was readily triggered by low doses of IL-15. This could provide a first molecular basis to explain the dual effect of IL-15 on NK cells. We also showed that IL-15 controls mTOR activity both *in vitro* and *in vivo*. This is confirmed by the observation that NK cells harvested from mice with NK cell specific mTOR deletion are arrested at the immature CD11b<sup>low</sup> CD27<sup>high</sup> stage and their activation in

response to poly(I:C) or IL-15 is severely impaired. Interestingly, survival of mTOR deficient NK cells is not affected in accordance with previous studies suggesting that the pro-survival signals given by IL-15 are mediated by STAT5 (62). Preliminary results suggest that only a fraction of mTOR activity is controlled via PI3K. This would fit with the fact that the phenotype of mTOR deficient NK cells is much stronger than PI3K deficient cells. The identity of the relevant mTORC1 or mTORC2 downstream targets remains to be addressed.

Apart from STAT5, the transcription factors, downstream of IL-15 are not characterized. It is worth mentioning the fact that upon MCMV infection, NK cells activate the E2F pathway, a phenomenon that can be blocked using blocking IL-2/15R $\beta$  antibodies (71). As IL-2 has been shown to mediate its proliferative effects through E2F activation (72), we can hypothesize that E2F is also involved in IL-15 induced proliferation. This has however not been formally tested. Moreover IL-15 stimulation leads to NF- $\kappa$ B p65-mediated increase in Myc expression in a context of IL-15 driven leukemia (28).

## IL-2

As discussed above, a number of IL-15 effects are recapitulated by *in vitro* treatment with IL-2. In particular, it has long been known that activated cytotoxic NK cells from BM culture can be generated after exposure to IL-2 (73, 74). However, when IL-2 and IL-15 were compared, 10 to 50 times more IL-2 than IL-15 was needed to activate NK cells (37). This is due to the fact that NK cells do not express the high affinity IL-2 receptor due to their lack of IL-2R $\alpha$  expression at steady-state. Instead, trans-presentation of IL-15 allows sensing of nanomolar quantities by cells expressing only IL-2/15R $\beta$  and  $\gamma$ c (54). Whether IL-2 *in vitro* effects are relevant *in vivo* is difficult to evaluate. Indeed, effect on NK cells of mutations affecting IL-2 signaling are difficult to interpret since they result in overt auto-immunity due to the role of IL-2 in the generation and maintenance of Treg cells. To avoid this caveat, mice deficient both for IL-2 and T cells have been generated. NK cell differentiation and numbers are normal in these *Rag*<sup>-/-</sup> *IL2*<sup>-/-</sup> double deficient mice. IL-2 is thus not needed for maintenance of NK cell homeostasis in the absence of T and B cells (13). This is concordant with the fact that, unlike IL-15, which is produced under homeostatic conditions, IL-2 production mainly results from stimulation of the immune system. This cytokine could nevertheless play a role during NK cell priming following inflammatory challenge. Two studies even suggested that IL-2 could play a non-redundant role in this process (75, 76). Indeed, Granucci et al. described a non-redundant role for IL-2 produced by DCs in the first hours following bacterial challenge (76). In this study, DC-derived IL-2 was important for the induction of IFN- $\gamma$  secretion by NK cells while induction of cytotoxicity was independent of IL-2. A direct contact between the NK and the DC was needed, suggesting that other molecules were involved. This interaction was functionally relevant for bacterial clearance and anti-tumor response. One caveat of this study is however the use of IL-2 deficient DCs differentiated from BM harvested from IL-2 deficient hosts in which T cell dependent auto-immunity develops. Another study described that, following *Leishmania major* infection, the T cell-derived IL-2 was necessary for the induction



of IFN- $\gamma$  secretion by NK cells (75). These findings are challenged by the fact that NK cell priming does not happen in the absence of IL-15 (29, 34, 35). A possibility to reconcile these studies would be to imagine cooperation between the two cytokines, both being needed. In this context, cytotoxicity induction would be under IL-15 control specifically since IL-2 only impacts IFN- $\gamma$  production in these models (75, 76). The fact that 2 cytokines signaling through the same IL-2R $\beta$ / $\gamma$ c-STAT5-mTOR axis lead to such dissociated effects could be due to difference in the spatio-temporal availability as well as the mode of delivery of these cytokines to NK cells. In any case, this issue remains open for further investigations.

Interest for the IL-2 dependent control of NK cells has recently been renewed by a series of studies proposing that NK cell activity was kept in check by Treg cells buffering excess IL-2 produced by activated T cells (77, 78). In these studies, the authors show that systemic Treg cell depletion leads to an increase in CD4 T cell derived IL-2. This increased IL-2 availability was correlated to increased NK cell IFN- $\gamma$  production (78) and cytotoxicity toward missing-self targets (77) and could be abrogated by blocking IL-2 antibody treatment. Similar findings have been reported upon transfer of *in vitro* pre-activated NK cells in an irradiated host (79). Mechanistically, Gasteiger et al. linked this increased responsiveness to a better capacity to generate conjugates with target cells after even very short-term exposure to IL-2. Interestingly, this increased cytotoxic capacity was only evidenced against missing-self targets, IL-2 being unable to increase cytotoxicity toward cells expressing both inhibitory and activating ligands. The same group also described phenotypical changes of the NK cell population with the progressive emergence of a CD127<sup>+</sup> immature NK cell population following Treg depletion (80). A similar population also accumulated in tumor-bearing or chronically infected animals. This population was able to up-regulate IL-2R $\alpha$  upon low dose IL-12 stimulation confirming previous findings (81). The authors interpreted this result as an increase in the capacity to sense and use IL-2. However, expression of IL-2R $\alpha$  also renders cells more sensitive to IL-15 (54), the cytokine involved in the homeostasis of this population is thus debatable.

At this stage, we can conclude that DCs and monocytes probably have a prominent role in NK cell activation, through IL-15 trans-presentation. However, this does not exclude the fact that other closely related cytokines like IL-2 and other cell types like T cells or NK cells themselves can contribute and in some conditions replace the IL-15 priming.

### IL-21

IL-21R was discovered independently by two groups, it is homolog to IL-2R $\beta$  and its ligand, IL-21, homolog to IL-2, IL-4, and IL-15 with the strongest similarity with the latest (82, 83). Upon IL-21 binding, IL-21R pairs with  $\gamma$ c and signals through JAK1 and STAT5 (82). IL-21 is expressed by activated CD4 T cells while IL-21R is found on lymphoid cells (83, 84). Its first effects described on human NK cells were a potentiation of differentiation from BM progenitors and activation of mature NK cells (83). These effects were in accordance with further studies showing that IL-21 inhibits IL-15 effects on NK cell proliferation but potentiates IL-15 driven NK cell terminal differentiation, i.e., cytotoxicity and IFN- $\gamma$  secretion (84–87). Forced expression of IL-21 *in vivo* by

hydrodynamic plasmid delivery decreases, in an NK cell dependent manner, the number of lung metastasis obtained after tumor cell lines injection (85). Given that IL-21 boosts T cell proliferation *in vitro*, it was suggested that its production by activated T cells could help shutdown the NK cell response once adaptive immunity was functional (84). However no *in vivo* data came to confirm this hypothesis. IL-21 produced by CD4 T cells is essential to prevent CD8 T cell exhaustion during chronic viral infections (88–90). In addition to direct positive effects on antiviral T cells, IL-21 restricts virus-driven Treg cell expansion and their suppressive effect on CD8 T cells (91). Whether IL-21 also controls the function of NK cells during chronic infections remains to be formally tested even though *ex vivo* treatment of NK cells from HIV-infected patients with IL-21 improves their effector function (92, 93).

### IL-7

IL-7, another member of the  $\gamma$ c family of cytokines signaling via STAT5, is well known for its role during early steps of B and T cell development in the BM and thymus respectively (94). The fact that early pre-pro NK cells and immature NK cells express high levels of IL-7R $\alpha$  (6) is puzzling since NK cell development and acquisition of effector functions is perfectly normal in the absence of IL-7 (13, 95). It should be noted that IL-7R $\alpha$  is also used in combination with the Cytokine Receptor-like factor 2 to form the thymic stromal lymphopoietin receptor (TSLPR). Whether this cytokine plays a role in early stages of NK cell physiology is unknown. It has however been shown to regulate CD3 T cell viability (96). A peculiar thymic IL-7-dependent NK cell subset has also been described (97). This subset is present in minute amount in mice thymi (between 10,000 and 100,000 cells), is virtually absent in *Il7*<sup>-/-</sup> animals, expresses IL-7R $\alpha$  and depends on GATA-3 in contrast to BM derived NK cells. Functionally, these NK cells are poorly cytolytic but secrete higher amount of cytokines than conventional NK cells. Given the very low abundance of this population, their function has not been investigated.

### IL-4

IL-4 is also a member of the  $\gamma$ c family of cytokines, well known for its pro-Th2 effects during T cell differentiation. Its absence does not affect NK cell generation and homeostasis (13). However, NK cells express the IL-4 receptor as evidenced by their sensitivity to IL-4 treatment *in vitro* (86). Of note is the strong ability of IL-4 to repress some key NK effector functions, such as cytokine production or cytotoxicity. Indeed, it has been demonstrated that IL-4 suppresses the inflammatory cytokine (IFN- $\gamma$ , TNF $\alpha$ , and GM-CSF) production-increase that is induced following IL-12 treatment in human NK cells (98). Similarly, in mouse NK cells, IL-4 treatment induces a decrease in the cytokine-induced-cytolytic-activity toward tumor cells or immature DC. The mode of action of IL-4 did not involve a down regulation of perforin or granzyme-B by NK cells but could be mediated through NKG2D down regulation (86, 98). In line with these observations, the capacity of NK cells to shape the adaptive immune response and favor a polarized Th1 response through interactions with DCs is abrogated when NK cells are pretreated with IL-4 (99). IL-4 treated NK cells are unable to induce DC maturation and favor tolerogenic or Th2 responses (99).



As mentioned above, another measurable effect of IL-4 was to down regulate NKG2D and other NK cell markers expression *in vitro* and *in vivo* and as a result to decrease NKG2D dependent cell killing (86). Similarly IL-4 treatment has been shown to down regulate NKG2D and CCL5 expression by memory CD8 T cells (100–102). This is in contrast to the promotion, by IL-4, of innate memory-like CD8 T cells generation that has been recently described (103). In the mouse strain Balb/c, high frequency of IL-4-secreting PLZF<sup>+</sup> NKT cells is associated with increased proportion of memory phenotype CD8 T cells compared to C57Bl/6 mice (104). The generation of this memory population has been shown to be dependent on IL-4, as revealed by the lack of memory phenotype CD8 T cells in *Cd1d*<sup>-/-</sup> and *Il4r*<sup>-/-</sup> mice. IL-4 produced during the course of a Th2 response is thought to act in a similar way, as it induces a strong proliferation of memory phenotype as well as naive CD8 T cells (105). The stimulation of memory CD8 T cells by IL-4 induces a strong up-regulation of the Eomes transcription factor (104). Given the implication of Eomes in NK cell differentiation, it is tempting to speculate that IL-4 could have far reaching effects on NK cell biology.

## IL-12 FAMILY

The IL-12 family of cytokines is constituted by heterodimeric cytokines presenting a four  $\alpha$ -helix bundle structure and belonging to the IL-6 super-family (106). The constituting heterodimers of this family are formed by combination of two possible  $\beta$ -chains and three possible  $\alpha$ -chains. Indeed, the cytokine  $\beta$ -chains are components of two cytokines (p40 of IL-12 and IL-23 and Ebi3 of IL-27 and IL-35) while  $\alpha$ -chains include p35, components of IL-12 and IL-35, p19 component of IL-23, and p28 component of IL-27. On the receptor side, IL-12 is recognized by an IL-12R $\beta$ 1/ $\beta$ 2 receptor, IL-23 by an IL-12R $\beta$ 1/IL-23R heterodimer, IL-27 by an IL-27R/gp130 complex, and IL-35 by a gp130/IL-12R $\beta$ 2. They have activating as well as inhibitory roles on the immune system, IL-12 and IL-23 being seen as more pro-inflammatory while IL-27 and IL-35 have been more described as inhibitory. Moreover, given the receptors and ligands promiscuity, some members can compete with others generating a complexity far from being understood.

## IL-12

### DISCOVERY/RECEPTORS

IL-12 was purified at the end of the 80s from the supernatant of EBV immortalized B cell lines and named NK cell stimulating factor (NKSF) for its ability to induce IFN- $\gamma$ , cytotoxic activity, and proliferation of NK cells *in vitro* (107). NKSF was later renamed IL-12 and is constituted of two polypeptides: IL-12p40 and p35 covalently linked by disulfide bonds, and binding to a heterodimeric receptor composed of IL-12R $\beta$ 1 and  $\beta$ 2. Importantly, NK cell constitutively express both chains of the IL-12R (108).

### REGULATION/PRODUCTION

IL-12 is produced by several types of Antigen Presenting Cells, including DCs (109, 110) and activated macrophages (48, 111). *In vivo*, IL-12 is produced early after viral infection (112). The inducing signals include pathogen derivative (113), sensed by TLRs and the RIG I pathway, but also molecules expressed by activated T cells like CD40L (109), or the NK cell derived IFN- $\gamma$  (114–116).

The exact mechanism leading to IL-12 production can be more complex as is the case following CpG stimulation. Indeed, upon CpG injection *in vivo*, IL-12 is induced by IL-15 after a cross-talk between conventional DCs and plasmacytoid DCs (117). Interestingly, IL-12 delivery seems to involve the formation of a synapse between the NK cell and the DC involving the polarization of the DC's secretory apparatus toward the NK cell (118).

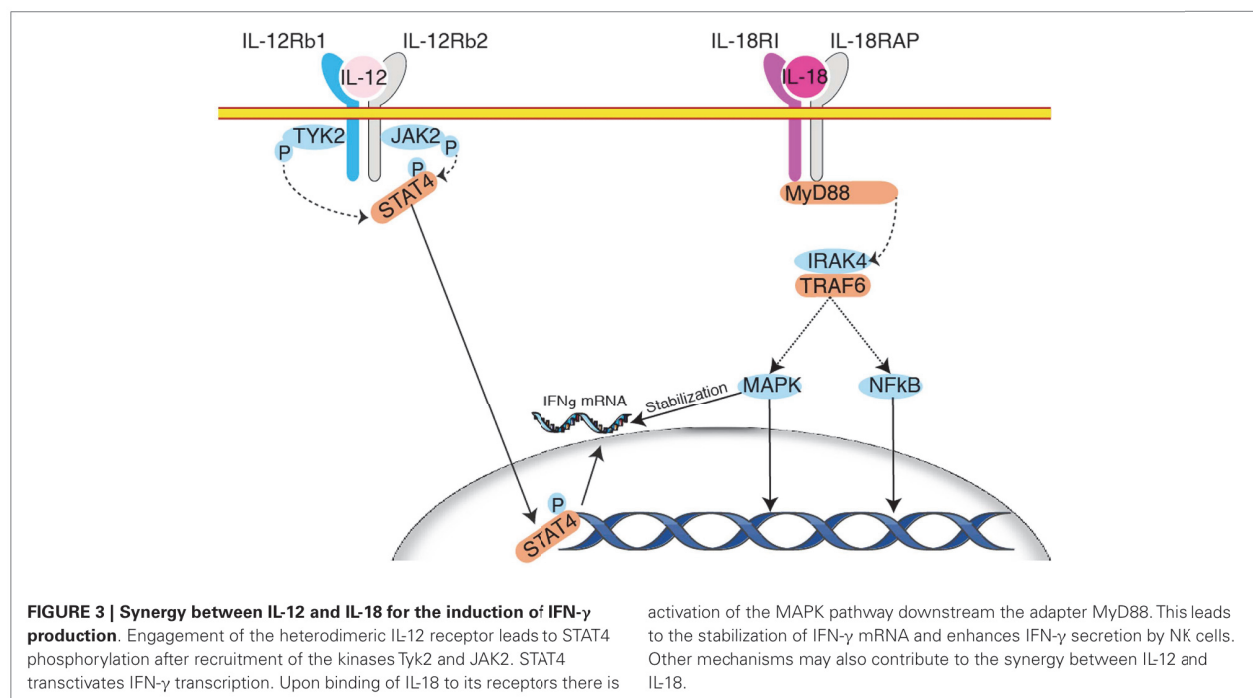
### SIGNALING

Upon binding, IL-12R $\beta$ 2 becomes tyrosine phosphorylated and provides docking sites for the kinases tyk2 and Jak2 leading to the phosphorylation and activation of STAT4 (119–121). The importance of tyk2 and STAT4 in NK cells is manifested by the sharp decrease of IFN- $\gamma$  production in mice deficient for these molecules (40, 121). One report also suggests that some of IL-12 effects are mediated by PKC $\theta$  (122), however no further study has confirmed this point.

### ROLE

The major role of IL-12 *in vivo* is to induce IFN- $\gamma$  production, while a marginal effect was described at first on early proliferation and development of cytotoxicity (40, 112, 123). Indeed, IFN- $\gamma$  production is reduced 20-fold in IL-12p35 deficient mice while cytotoxicity is intact (40), antibody mediated blocking of the cytokine leads to similar results (112). Moreover, microscopy studies have shown a perfect time- and location-dependent correlation between IL-12 production by DCs and IFN- $\gamma$  production by NK cells in *Listeria* induced granuloma (124). As IFN- $\gamma$  can itself promote IL-12p40 expression, it generates a positive feedback loop promoting inflammation and the differentiation of monocytes into DCs (114, 124). More recently, it has been shown that IL-12 in combination with another cytokine, IL-18, helps optimal NK cell expansion (125, 126) an effect which is not dependent on IFN- $\gamma$  secretion. Moreover, in some settings, IL-12/IL-18 can drive an IL-15 independent response of NK cells (127, 128). However these results are controversial, indeed, another study found no or only a very minor role of IL-18 and IL-12 for the promotion of the expansion of Ly49H<sup>+</sup> NK cells during MCMV infection *in vivo* (129). Moreover, the settings used in one study are very peculiar since they involve adoptive transfer of WT NK cells in *Il15*<sup>-/-</sup>  $\times$  *Il15 $\alpha$* <sup>-/-</sup> mice to unmask the IL-12 dependent proliferative effects (128).

At the molecular level, induction of IFN- $\gamma$  by IL-12 secretion relies on increased transcription as determined by run-on experiments (130). This transcriptional response is abrogated in tyk2 deficient mice (121). IFN- $\gamma$  mRNA, like many other cytokine messengers, bears AU rich elements in its 3'UTR, which renders it unstable (131) moreover, it is also a target for miRNA mediated regulation (132). Hence, a large part of its expression relies on post-transcriptional regulation. In this context, it has been shown that IL-18 stabilizes the IFN- $\gamma$  mRNA through the activation of a MAPK p38 dependent pathway (133) (Figure 3). This effect explains at least in part the formidable synergy existing between IL-12 and IL-18 on induction of IFN- $\gamma$  secretion (134). Interestingly, IL-12 in combination with IL-18 can also trigger IFN- $\gamma$  secretion by memory T cells *in vivo* in an antigen independent fashion underlying acquisition of "innate-like" capacities by these cells (38, 135). Conversely, several groups have been able to induce



long-term survival of an NK cell population by transferring NK cells briefly activated *in vitro* in the presence of IL-12 and IL-18 in sublethally irradiated (79) or *Rag*<sup>-/-</sup> hosts (136). This echoes the concept of NK cell memory proposed in 2006 by the group of von Andrian (137). Indeed, under particular circumstances, a fraction of the activated NK pool survives the resolution of the response and is able to mount recall responses (126). This property is severely impaired in the absence of IL-12 (126). How exposure to these cytokines imprints long-term survival onto NK cells in these particular settings is not understood and could constitute fertile ground for further discoveries.

As previously mentioned, IL-12, in synergy with IL-18, has the capacity to induce IL-2Rα on NK cells (81, 86), the CD127<sup>+</sup> population of NK cells being extremely sensitive to this stimulation (80). This property may help to explain the sustained IL-2-dependent proliferation of IL-15/IL-12/IL-18 pre-activated NK cells after *in vivo* transfer (79). IL-18 is not the only cytokine synergizing with IL-12. Indeed, early studies described a synergy between IL-12 and IL-2 (107). Similarly to IL-18, the synergy between IL-12 and IL-2 also involves regulation of IFN-γ mRNA half-life (130).

### IL-18

IL-18 is a cytokine that was originally identified as an IFN-γ inducible factor (IGIF) (138) and it appears to share its biologic functions with IL-12, including enhancement of the NK cell activity (139). Its absence leads to decreased NK cell response in a variety of models (140, 141). It is part of the IL-1 family which comprises 11 members (142). It is produced as an inactive pro-IL-18 precursor. In contrast to other IL-1 family member such as IL-1β, proIL-18 is constitutively expressed (143). ProIL-18 requires cleavage by active caspase-1 in the inflammasome complex to

generate biologically active IL-18 (144, 145). Other proteases [caspase-8 (146, 147), proteinase-3 (148), granzyme-B (149)] have been reported to cleave proIL-18 and generate bioactive cytokine. The physiologic producers of IL-18 include myeloid cells such as activated macrophages (138, 150), dendritic cells (151), neutrophils (152), and Ly6C<sup>+</sup>CCR2<sup>+</sup> inflammatory monocytes (38). In addition, IL-18 is expressed in numerous non-hematopoietic lineages (153). IL-18 mature form is a leaderless protein secreted via a poorly understood mechanism (154). The ability of IL-18 released by macrophages or DCs to activate the production of IFN-γ by NK cells is dependent on cell-to-cell contact (155–159). In agreement with this cell-to-cell contact requirement, IL-18 secretion by DC is polarized and occurs at the immunological synapse formed between the DC and the NK cell (160). Furthermore, another regulatory step may include the presence of a membrane-bound form of IL-18 as an intermediate between the cytosolic pro IL-18 and the mature soluble IL-18 (161). Finally, IL-18 signaling can be antagonized by IL-18BP, which is limiting the systemic effects of this cytokine (162).

Upon IL-18 binding, its primary receptor, IL-18R1, dimerizes with a second receptor subunit: IL-18R accessory protein (IL-18RAP). This recruits myeloid differentiation primary response protein 88 (MyD88) and initiates signaling through IL-1R-associated kinase 4 (IRAK4) and TNFR-associated factor 6 (TRAF6), leading to activation of the NF-κB and MAPK pathways. The importance of IL-18 for NK cells is underlined by the fact that at steady state, NK cells are the only hematopoietic cells analyzed by the Immunological Genome Project to contain consequent levels of transcripts for IL-18R1 and IL-18RAP ([www.immgen.org](http://www.immgen.org)). This expression grants them with exquisite sensitivity to IL-18 stimulation (150). Moreover, NK from IL-18R1-deficient mice



have decreased IFN- $\gamma$  secretion and cytotoxic capacities (163). A similar phenotype is observed in IRAK4 deficient NK cells (164). Other pathways may also be activated as suggested by impaired IFN- $\gamma$  secretion in response to IL-12/18 stimulation in p110 $\gamma$  or  $\delta$  deficient NK cells (65, 66). IL-18 is critical for IFN- $\gamma$  production by NK cells during numerous bacterial (165), fungal (166), parasites (127), and viral (167) infections. In addition to regulating IFN- $\gamma$  production, IL-18 takes part to the priming of NK cells (29, 168), and leads to the acquisition of novel migratory function through up-regulation of CCR7 (155, 169). It has also been shown that IL-18 induces the release of CC chemokine Ligand 3 (CCL3) by NK cells, which in turns recruits inflammatory monocytes in the intestine and contribute to local inflammation (170).

The role of IL-18 in regulating the anti-tumoral activity of NK cells is unclear and might be highly dependent of the other signals received by NK cells concomitantly to IL-18. Indeed IL-18 has been shown to promote tumor immuno-suppression and tumor growth by converting Kit<sup>-</sup> NK cells into Kit<sup>+</sup> NK cells. NK cells from this Kit<sup>+</sup> subset have the potential to lyse DCs leading to a reduction in the tumor immuno-surveillance (171). In contrast, others studies have demonstrated an anti-tumor effect of IL-18 (172, 173) in part through the generation of “helper” NK cells producing CCL3 and CCL4, which results to the local recruitment of DCs and effector CD8 T cells (174).

As detailed above, the main effect of IL-18 on NK cells is to synergize with IL-12 to induce IFN- $\gamma$  production. However, in some systems, IL-12 can be dispensable while IL-18 is not (29, 175). Importantly, if systemic IFN- $\gamma$  production depends on IL-12/IL-18 synergy, local IFN- $\gamma$  production in the liver can be preserved in the absence of IL-18 and be sufficient to allow host survival upon MCMV infection (167).

### TRANSFORMING GROWTH FACTOR- $\beta$ PRODUCTION

Transforming growth factor- $\beta$  is a cytokine with a pivotal role in the regulation of the immune system. TGF $\beta$ 1 is the predominant TGF $\beta$  isoform expressed in the immune system. TGF $\beta$  associates non-covalently with the latency-associated protein (LAP), forming a complex called the small latent complex (SLC). The SLC can be secreted as such or in association with latent TGF $\beta$ -binding protein (LTBP) as a large latent complex (LLC). TGF $\beta$  must be released from the complexes to bind to TGF $\beta$  receptors (176). This can be achieved through different mechanisms that remain mostly unclear. TGF $\beta$  binding proteins control ligand access but can also act as ligand reservoirs (177). Virtually all cells of the immune system can produce TGF $\beta$ . TGF $\beta$  is regulated at transcriptional, post-transcriptional, and post-translational levels. It is therefore difficult to precisely determine the sources of active TGF $\beta$  during immune responses.

### SIGNALING

Transforming growth factor- $\beta$  mediates its biological functions through binding to type I and II transmembrane serine/threonine kinase receptors. TGF $\beta$ 1 signals mostly via TGFBR1 (type I receptor) and TGFBR2 (type II receptor). TGFBR1 is not necessary for binding to TGF $\beta$  but initiates signaling. Two signaling pathways have been described that are dependent or not on smad

transcription factors. Receptor-associated smads (mostly R-smad 2 and 3 in the immune system) are sequestered in the cytoplasm in the absence of signaling. Upon phosphorylation by TGFBR1, R-smad 2 and 3 interact with the common mediator smad-4 and are translocated into the nucleus. Smad complexes recruit other transcription factors to activate or repress the expression of a wide range of genes. Various Smad-independent TGF $\beta$  signaling pathways operate in a context-dependent manner and contribute to cell-specific biological responses. TGF $\beta$  may thus activate small GTPases, MAP kinases, and the PI3K pathway (177). In T cells, a JNK-c-Jun pathway has been shown to suppress the expression of Eomes in Th17 cells in response to TGF $\beta$  (178). In NK cells, smad-independent TGF $\beta$  signaling pathways have not been addressed.

### IMPACT OF TGF $\beta$ ON NK CELLS

The addition of recombinant TGF $\beta$  in cultures of mouse spleen cells or human PBMC with IL-2 *in vitro* has long been shown to reduce NK cell proliferation and cytotoxicity (179–182). Administration of TGF $\beta$  also depresses NK cell activity in mice (183), and reduces their proliferation during antiviral responses (184) while blocking TGF $\beta$  increases NK cell cytotoxic activity (185). It was later found that TGF $\beta$  also counteracts IL-12 mediated cytokine production by mouse NK cells (186, 187) and human NK cells (188, 189). TGF $\beta$  not only counteracts the effects of IL-2 and IL-12 but also reduces IFN- $\gamma$  production in response to the engagement of the Fc receptor CD16 on human NK cells (190). Finally, TGF $\beta$  also shapes the NK cell surface by reducing the expression of NK cell receptors NKG2D and NKp30 (191, 192) and changes their trafficking properties by modulating the expression of chemokine receptors (193).

When does TGF $\beta$  act on NK cells *in vivo*? Early studies show that TGF $\beta$  is produced during viral infections, especially by T cells at late stages of infection, which could help limiting NK cell cytotoxicity (194). More recent studies show that the transgenic expression of a dominant negative form of the TGFBR2 receptor in CD11c positive cells (including dendritic cells and NK cells) dramatically increases the number of mature NK cells (195), suggesting that TGF $\beta$  negatively regulates NK cell development and maturation at steady-state, especially during infancy (196). The smad-dependent pathway has been shown to be important to limit NK cell IFN- $\gamma$  production by repressing the expression of T-bet (189). Whether this pathway also limits NK cell proliferation and cytotoxicity induced by pro-inflammatory cytokines remains to be determined. Early studies have suggested that TGF $\beta$  acts very rapidly, perhaps in a smad3 independent manner to decrease tyrosine phosphorylation induced by IL-2 (197).

### IL-10

IL-10 was described as a Th2 cytokine that inhibited Th1 cytokine synthesis (198). It is now known to be produced by macrophages, DCs, B cells, various subsets of T cells, and NK cells themselves (199–202). NK cells constitutively express both chains of IL-10 receptor (Immgen data). Several diverging effects of IL-10 on NK cells have been described (203–207). Most of these effects seem to be indirect, indeed, IL-10 *in vitro* treatment of purified NK cells does not have noticeable effects (86). However, to the best of our

knowledge, this has not been thoroughly tested using chimeras or transfer of IL-10R deficient or sufficient NK cells in IL-10 sufficient hosts. The experiments of *in vivo* blockade using antibodies being non-informative about the responding cell type (208, 209).

### IFN I

IFN- $\alpha/\beta$  or type I IFN (IFN I) were originally identified as proteins responsible for induction of cellular resistance to viral infections. They are produced by various immune and non-immune cell types. According to a recent study, the capacity of mononuclear phagocytes (i.e., DCs and macrophages) to express IFN I and subsequently IL-15 after microbial challenge could be imprinted by previous contact with the microbial flora (210). However this results still awaits confirmation. IFN I effects on NK cells have been known for a long time. Indeed, IFN I induce NK cell proliferation and cytotoxicity (211). However, IFN I receptor (IFNAR) deficiency can be compensated by recombinant IL-15 injection (40). The bulk of IFN I effects are thus probably mediated through release of IL-15 as recently confirmed by a systems biology analysis of the response to MCMV viral infection (71). In this study, the authors show that IFN-stimulated genes were not strongly up regulated by NK cells, suggesting that, at least at the transcriptional level, these cells were not the primary targets of IFN I. This lower responsiveness was associated with a lower expression of STAT1 by NK cells. IFN I dependent effects on NK cells are however not absent and some studies have evidenced a direct role of IFN I on the induction of NK cell cytotoxicity (212, 213).

### CONCLUDING REMARKS

Natural killer cell development and function depend on a multiplicity of cytokines which have complementary as well as overlapping functions. A complete understanding of their action will require the precise identification of the cell types producing them, the time window during which they are produced and the signaling events that their receptors engage in NK cells. These various parameters and the outcome on NK cells could be very different depending on the infectious agent. The role of some cytokines such as IL-2 may thus be important only with particular pathogens and efforts should therefore be made to diversify the models of infection. Moreover, many cytokine effects are only seen when combining them, as best exemplified by IL-12 and IL-18. It is therefore essential to define the relevant cytokine combinations in different niches and to delineate the signaling pathways they induce as well as their combined effects on NK cells. How NK cells integrate signals from activating and inhibitory cytokines and which molecules act as “integrators” are important issues to address. Recent technological advances such as mass cytometry will be instrumental for this purpose in that they allow the simultaneous measurement of up to 100 parameters using very low cell numbers. The latter technique can be applied to the study of cell signaling using phospho-specific antibodies raised against various molecules of the transduction machinery. Recently generated NK-specific Cre-expressing mouse lines will also be important to discriminate between direct vs. indirect effects of various cytokines on *in vivo* NK cell physiology.

### REFERENCES

- Vivier E, Tomasello E, Baratin M, Walzer T, Ugolini S. Functions of natural killer cells. *Nat Immunol* (2008) **9**:503–10. doi:10.1038/ni1582
- Diefenbach A, Raulet DH. Natural killer cells: stress out, turn on, tune in. *Curr Biol* (1999) **9**:R851–3. doi:10.1016/S0960-9822(00)80044-5
- Spits H, Artis D, Colonna M, Diefenbach A, Di Santo JP, Eberl G, et al. Innate lymphoid cells – a proposal for uniform nomenclature. *Nat Rev Immunol* (2013) **13**:145–9. doi:10.1038/nri3365
- Haller O, Wigzell H. Suppression of natural killer cell activity with radioactive strontium: effector cells are marrow dependent. *J Immunol* (1977) **1950**(118):1503–6.
- Seaman WE, Gindhart TD, Greenspan JS, Blackman MA, Talal N. Natural killer cells, bone, and the bone marrow: studies in estrogen-treated mice and in congenitally osteopetrotic (mi/mi) mice. *J Immunol* (1979) **1950**(122):2541–7.
- Carotta S, Pang SHM, Nutt SL, Belz GT. Identification of the earliest NK-cell precursor in the mouse BM. *Blood* (2011) **117**:5449–52. doi:10.1182/blood-2010-11-318956
- Rosmaraki EE, Douagi I, Roth C, Colucci F, Cumano A, Santo JPD. Identification of committed NK cell progenitors in adult murine bone marrow. *Eur J Immunol* (2001) **31**:1900–9. doi:10.1002/1521-4141(200106)31:6<1900::AID-IMMU1900>3.0.CO;2-M
- Noguchi M, Yi H, Rosenblatt HM, Filipovich AH, Adelstein S, Modi WS, et al. Interleukin-2 receptor  $\gamma$  chain mutation results in X-linked severe combined immunodeficiency in humans. *Cell* (1993) **73**:147–57. doi:10.1016/0092-8674(93)90167-O
- DiSanto JP, Müller W, Guy-Grand D, Fischer A, Rajewsky K. Lymphoid development in mice with a targeted deletion of the interleukin 2 receptor gamma chain. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1995) **92**:377–81. doi:10.1073/pnas.92.2.377
- Suzuki H, Duncan GS, Takimoto H, Mak TW. Abnormal development of intestinal intraepithelial lymphocytes and peripheral natural killer cells in mice lacking the IL-2 receptor  $\beta$  chain. *J Exp Med* (1997) **185**:499–506. doi:10.1084/jem.185.3.499
- Kennedy MK, Glaccum M, Brown SN, Butz EA, Viney JL, Embers M, et al. Reversible defects in natural killer and memory CD8 T cell lineages in interleukin 15-deficient mice. *J Exp Med* (2000) **191**:771–80. doi:10.1084/jem.191.5.771
- Lodolce JP, Boone DL, Chai S, Swain RE, Dassopoulos T, Tretten S, et al. IL-15 receptor maintains lymphoid homeostasis by supporting lymphocyte homing and proliferation. *Immunity* (1998) **9**:669–76. doi:10.1016/S1074-7613(00)80664-0
- Vosshenrich CAJ, Ranson T, Samson SI, Corcuff E, Colucci F, Rosmaraki EE, et al. Roles for common cytokine receptor gamma-chain-dependent cytokines in the generation, differentiation, and maturation of NK cell precursors and peripheral NK cells in vivo. *J Immunol* (2005) **174**:1213–21.
- Burton JD, Bamford RN, Peters C, Grant AJ, Kurys G, Goldman CK, et al. A lymphokine, provisionally designated interleukin T and produced by a human adult T-cell leukemia line, stimulates T-cell proliferation and the induction of lymphokine-activated killer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1994) **91**:4935–9. doi:10.1073/pnas.91.11.4935
- Grabstein KH, Eisenman J, Shanebeck K, Rauch C, Srinivasan S, Fung V, et al. Cloning of a T cell growth factor that interacts with the beta chain of the interleukin-2 receptor. *Science* (1994) **264**:965–8. doi:10.1126/science.8178155
- Giri JG, Ahdieh M, Eisenman J, Shanebeck K, Grabstein K, Kumaki S, et al. Utilization of the beta and gamma chains of the IL-2 receptor by the novel cytokine IL-15. *EMBO J* (1994) **13**:2822.
- Bamford RN, Grant AJ, Burton JD, Peters C, Kurys G, Goldman CK, et al. The interleukin (IL) 2 receptor beta chain is shared by IL-2 and a cytokine, provisionally designated IL-T, that stimulates T-cell proliferation and the induction of lymphokine-activated killer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1994) **91**:4940–4. doi:10.1073/pnas.91.11.4940
- Rochman Y, Spolski R, Leonard WJ. New insights into the regulation of T cells by  $\gamma c$  family cytokines. *Nat Rev Immunol* (2009) **9**:480–90. doi:10.1038/nri2580
- Giri JG, Kumaki S, Ahdieh M, Friend DJ, Loomis A, Shanebeck K, et al. Identification and cloning of a novel IL-15 binding protein that is structurally related to the alpha chain of the IL-2 receptor. *EMBO J* (1995) **14**:3654–63.
- Dubois S, Mariner J, Waldmann TA, Tagaya Y. IL-15R $\alpha$  recycles and presents IL-15 in trans to neighboring cells. *Immunity* (2002) **17**:537–47. doi:10.1016/S1074-7613(02)00429-6



21. Mortier E, Woo T, Advincula R, Gozalo S, Ma A. IL-15R chaperones IL-15 to stable dendritic cell membrane complexes that activate NK cells via trans presentation. *J Exp Med* (2008) **205**:1213–25. doi:10.1084/jem.20071913
22. Burkett PR, Koka R, Chien M, Chai S, Boone DL, Ma A. Coordinate expression and trans presentation of interleukin (IL)-15R $\alpha$  and IL-15 supports natural killer cell and memory CD8+ T cell homeostasis. *J Exp Med* (2004) **200**:825–34. doi:10.1084/jem.20041389
23. Huntington ND, Legrand N, Alves NL, Jaron B, Weijer K, Plet A, et al. IL-15 trans-presentation promotes human NK cell development and differentiation in vivo. *J Exp Med* (2009) **206**:25–34. doi:10.1084/jem.20082013
24. Koka R, Burkett PR, Chien M, Chai S, Chan F, Lodolce JP, et al. Interleukin (IL)-15R $\alpha$ -deficient natural killer cells survive in normal but not IL-15R $\alpha$ -deficient mice. *J Exp Med* (2003) **197**:977–84. doi:10.1084/jem.20021836
25. Prlic M, Blazar BR, Farrar MA, Jameson SC. In vivo survival and homeostatic proliferation of natural killer cells. *J Exp Med* (2003) **197**:967–76. doi:10.1084/jem.20021847
26. Schluns KS, Nowak EC, Cabrera-Hernandez A, Puddington L, Lefrançois L, Aguila HL. Distinct cell types control lymphoid subset development by means of IL-15 and IL-15 receptor  $\alpha$  expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2004) **101**:5616–21. doi:10.1073/pnas.0307442101
27. Fehniger TA, Suzuki K, Ponnappan A, VanDeusen JB, Cooper MA, Florea SM, et al. Fatal leukemia in interleukin 15 transgenic mice follows early expansions in natural killer and memory phenotype CD8+ T cells. *J Exp Med* (2001) **193**:219–31. doi:10.1084/jem.193.2.219
28. Mishra A, Liu S, Sams GH, Curphey DP, Santhanam R, Rush LJ, et al. Aberrant overexpression of IL-15 initiates large granular lymphocyte leukemia through chromosomal instability and DNA hypermethylation. *Cancer Cell* (2012) **22**:645–55. doi:10.1016/j.ccr.2012.09.009
29. Zononi I, Spreafico R, Bodio C, Di Gioia M, Cigni C, Broggi A, et al. IL-15 cis presentation is required for optimal NK cell activation in lipopolysaccharide-mediated inflammatory conditions. *Cell Rep* (2013) **4**(6):1235–49. doi:10.1016/j.celrep.2013.08.021
30. Cooper MA. In vivo evidence for a dependence on interleukin 15 for survival of natural killer cells. *Blood* (2002) **100**:3633–8. doi:10.1182/blood-2001-12-0293
31. Ranson T. IL-15 is an essential mediator of peripheral NK-cell homeostasis. *Blood* (2003) **101**:4887–93. doi:10.1182/blood-2002-11-3392
32. Huntington ND, Puthalakath H, Gunn P, Naik E, Michalak EM, Smyth MJ, et al. Interleukin 15-mediated survival of natural killer cells is determined by interactions among Bim, Noxa and Mcl-1. *Nat Immunol* (2007) **8**:856–63. doi:10.1038/ni1487
33. Fehniger TA, Cai SF, Cao X, Bredemeyer AJ, Presti RM, French AR, et al. Acquisition of murine NK cell cytotoxicity requires the translation of a pre-existing pool of granzyme B and perforin mRNAs. *Immunity* (2007) **26**:798–811. doi:10.1016/j.immuni.2007.04.010
34. Koka R, Burkett P, Chien M, Chai S, Boone DL, Ma A. Cutting edge: murine dendritic cells require IL-15R $\alpha$  to prime NK cells. *J Immunol* (2004) **173**:3594–8. doi:10.1084/jem.20041389
35. Lucas M, Schachterle W, Oberle K, Aichele P, Diefenbach A. Dendritic cells prime natural killer cells by trans-presenting interleukin 15. *Immunity* (2007) **26**:503–17. doi:10.1016/j.immuni.2007.03.006
36. Mortier E, Advincula R, Kim L, Chmura S, Barrera J, Reizis B, et al. Macrophage- and dendritic-cell-derived interleukin-15 receptor  $\alpha$  supports homeostasis of distinct CD8+ T cell subsets. *Immunity* (2009) **31**:811–22. doi:10.1016/j.immuni.2009.09.017
37. Puzanov IJ, Bennett M, Kumar V. IL-15 can substitute for the marrow microenvironment in the differentiation of natural killer cells. *J Immunol* (1996) **157**:4282–5.
38. Soudja SM, Ruiz AL, Marie JC, Lauvau G. Inflammatory monocytes activate memory CD8+ T and innate NK lymphocytes independent of cognate antigen during microbial pathogen invasion. *Immunity* (2012) **37**:549–62. doi:10.1016/j.immuni.2012.05.029
39. Castillo EF, Stonier SW, Frasca L, Schluns KS. Dendritic cells support the in vivo development and maintenance of NK cells via IL-15 trans-presentation. *J Immunol* (2009) **183**:4948–56. doi:10.4049/jimmunol.0900719
40. Nguyen KB, Salazar-Mather TP, Dalod MY, Deussen JBV, Wei X, Liew FY, et al. Coordinated and distinct roles for IFN- $\alpha$  $\beta$ , IL-12, and IL-15 regulation of NK cell responses to viral infection. *J Immunol* (2002) **169**:4279–87.
41. Tran P, Ahmad R, Xu J, Ahmad A, Menezes J. Host's innate immune response to fungal and bacterial agents in vitro: up-regulation of interleukin-15 gene expression resulting in enhanced natural killer cell activity. *Immunology* (2003) **109**:263–70. doi:10.1046/j.1365-2567.2003.01659.x
42. Orr SJ, Quigley L, McVicar DW. In vivo expression of signaling proteins in reconstituted NK cells. *J Immunol Methods* (2009) **340**:158–63. doi:10.1016/j.jim.2008.10.014
43. Orr SJ, Roessler S, Quigley L, Chan T, Ford JW, O'Connor GM, et al. Implications for gene therapy-limiting expression of IL-2R  $\gamma$  delineate differences in signaling thresholds required for lymphocyte development and maintenance. *J Immunol* (2010) **185**:1393–403. doi:10.4049/jimmunol.0903528
44. Lee GA, Liou Y-H, Wang S-W, Ko K-L, Jiang S-T, Liao N-S. Different NK cell developmental events require different levels of IL-15 trans-presentation. *J Immunol* (2011) **187**:1212–21. doi:10.4049/jimmunol.1100331
45. Ogasawara K, Hida S, Azimi N, Tagaya Y, Sato T, Yokochi-Fukuda T, et al. Requirement for IRF-1 in the microenvironment supporting development of natural killer cells. *Nature* (1998) **391**:700–3. doi:10.1038/35636
46. Burkett PR, Koka R, Chien M, Chai S, Chan F, Ma A, et al. IL-15R $\alpha$  expression on CD8+ T cells is dispensable for T cell memory. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2003) **100**:4724–9. doi:10.1073/pnas.0737048100
47. Schluns KS, Klonowski KD, Lefrançois L. Transregulation of memory CD8 T-cell proliferation by IL-15R $\alpha$ + bone marrow-derived cells. *Blood* (2004) **103**:988–94. doi:10.1182/blood-2003-08-2814
48. Doherty TM, Seder RA, Sher A. Induction and regulation of IL-15 expression in murine macrophages. *J Immunol* (1996) **156**:735–41.
49. Zhang X, Sun S, Hwang I, Tough DE, Sprent J. Potent and selective stimulation of memory-phenotype CD8+ T cells in vivo by IL-15. *Immunity* (1998) **8**:591–9. doi:10.1016/S1074-7613(00)80564-6
50. Colpitts SL, Stoklasek TA, Plumlee CR, Obar JJ, Guo C, Lefrançois L. Cutting edge: the role of IFN- $\alpha$  receptor and MyD88 signaling in induction of IL-15 expression in vivo. *J Immunol* (2012) **188**:2483–7. doi:10.4049/jimmunol.1103609
51. Colpitts SL, Stonier SW, Stoklasek TA, Root SH, Aguila HL, Schluns KS, et al. Transcriptional regulation of IL-15 expression during hematopoiesis. *J Immunol* (2013) **191**:3017–24. doi:10.4049/jimmunol.1301389
52. Heng TSP, Painter MW, Immunological Genome, Project Consortium. The Immunological Genome Project: networks of gene expression in immune cells. *Nat Immunol* (2008) **9**:1091–4. doi:10.1038/ni1008-1091
53. Oh S, Berzofsky JA, Burke DS, Waldmann TA, Perera LP. Coadministration of HIV vaccine vectors with vaccinia viruses expressing IL-15 but not IL-2 induces long-lasting cellular immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2003) **100**:3392–7. doi:10.1073/pnas.0630592100
54. Ring AM, Lin J-X, Feng D, Mitra S, Rickert M, Bowman GR, et al. Mechanistic and structural insight into the functional dichotomy between IL-2 and IL-15. *Nat Immunol* (2012) **13**(12):1187–95. doi:10.1038/ni.2449
55. Boussiotis VA, Barber DL, Nakarai T, Freeman GJ, Gribben JG, Bernstein GM, et al. Prevention of T cell anergy by signaling through the gamma c chain of the IL-2 receptor. *Science* (1994) **266**:1039–42. doi:10.1126/science.7973657
56. Miyazaki T, Kawahara A, Fujii H, Nakagawa Y, Minami Y, Liu ZJ, et al. Functional activation of Jak1 and Jak3 by selective association with IL-2 receptor subunits. *Science* (1994) **266**:1045–7. doi:10.1126/science.7973659
57. Russell SM, Johnston JA, Noguchi M, Kawamura M, Bacon CM, Friedmann M, et al. Interaction of IL-2R beta and gamma c chains with Jak1 and Jak3: implications for XSCID and XCID. *Science* (1994) **266**:1042–5. doi:10.1126/science.7973658
58. Zhu M, Berry JA, Russell SM, Leonard WJ. Delineation of the regions of interleukin-2 (IL-2) receptor  $\beta$  chain important for association of Jak1 and Jak3. Jak1-INDEPENDENT FUNCTIONAL RECRUITMENT OF Jak3 TO IL-2R $\beta$ . *J Biol Chem* (1998) **273**:10719–25. doi:10.1074/jbc.273.17.10719
59. Park SY, Saijo K, Takahashi T, Osawa M, Arase H, Hirayama N, et al. Developmental defects of lymphoid cells in Jak3 kinase-deficient mice. *Immunity* (1995) **3**:771–82. doi:10.1016/1074-7613(95)90066-7
60. Fujii H. Functional dissection of the cytoplasmic subregions of the IL-2 receptor beta c chain in primary lymphocyte populations. *EMBO J* (1998) **17**:6551–7. doi:10.1093/emboj/17.22.6551
61. Truitt KE, Mills GB, Turck CW, Imboden JB. SH2-dependent association of phosphatidylinositol 3'-kinase 85-kDa regulatory subunit with the interleukin-2 receptor beta chain. *J Biol Chem* (1994) **269**:5937–43.

62. Eckelhart E, Warsch W, Zebidin E, Simma O, Stoiber D, Kolbe T, et al. A novel Ncr1-Cre mouse reveals the essential role of STAT5 for NK-cell survival and development. *Blood* (2011) **117**:1565–73. doi:10.1182/blood-2010-06-291633
63. Imada K, Bloom ET, Nakajima H, Horvath-Arcidiacono JA, Udy GB, Davey HW, et al. Stat5b is essential for natural killer cell-mediated proliferation and cytolytic activity. *J Exp Med* (1998) **188**:2067–74. doi:10.1084/jem.188.11.2067
64. Guo H, Samarakoon A, Vanhaesebroeck B, Malarkannan S. The p110 of PI3K plays a critical role in NK cell terminal maturation and cytokine/chemokine generation. *J Exp Med* (2008) **205**:2419–35. doi:10.1084/jem.20072327
65. Kim N, Saudemont A, Webb L, Camps M, Ruckle T, Hirsch E, et al. The p110delta catalytic isoform of PI3K is a key player in NK-cell development and cytokine secretion. *Blood* (2007) **110**:3202–8. doi:10.1182/blood-2007-02-075366
66. Tassi I, Cella M, Gilfillan S, Turnbull I, Diacovo TG, Penninger JM, et al. p110gamma and p110delta phosphoinositide 3-kinase signaling pathways synergize to control development and functions of murine NK cells. *Immunity* (2007) **27**:214–27. doi:10.1016/j.immuni.2007.07.014
67. Polak R, Buitenhuis M. The PI3K/PKB signaling module as key regulator of hematopoiesis: implications for therapeutic strategies in leukemia. *Blood* (2012) **119**:911–23. doi:10.1182/blood-2011-07-366203
68. Saudemont A, Garçon F, Yadi H, Roche-Molina M, Kim N, Segonds-Pichon A, et al. p110γ and p110δ isoforms of phosphoinositide 3-kinase differentially regulate natural killer cell migration in health and disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2009) **106**:5795–800. doi:10.1073/pnas.0808594106
69. Bryceson YT, March ME, Ljunggren H-G, Long EO. Activation, ccactivation, and costimulation of resting human natural killer cells. *Immunol Rev* (2006) **214**:73–91. doi:10.1111/j.1600-065X.2006.00457.x
70. Zeng H, Chi H. mTOR and lymphocyte metabolism. *Curr Opin Immunol* (2013) **25**:347–55. doi:10.1016/j.coi.2013.05.002
71. Baranek T, Manh T-PV, Alexandre Y, Maqbool MA, Cabeza JZ, Tomasello E, et al. Differential responses of immune cells to type I interferon contribute to host resistance to viral infection. *Cell Host Microbe* (2012) **12**:571–84. doi:10.1016/j.chom.2012.09.002
72. Brennan P, Babbage JW, Burgering BM, Groner B, Reif K, Cantrell DA. Phosphatidylinositol 3-kinase couples the interleukin-2 receptor to the cell cycle regulator E2F. *Immunity* (1997) **7**:679–89. doi:10.1016/S1074-7613(00)80388-X
73. Grimm EA, Robb RJ, Roth JA, Neckers LM, Lachman LB, Wilson DJ, et al. Lymphokine-activated killer cell phenomenon. III. Evidence that IL-2 is sufficient for direct activation of peripheral blood lymphocytes into lymphokine-activated killer cells. *J Exp Med* (1983) **158**:1356–61. doi:10.1084/jem.158.4.1356
74. Strausser JL, Rosenberg SA. In vitro growth of cytotoxic human lymphocytes I. Growth of cells sensitized in vitro to alloantigens. *J Immunol* (1978) **121**:1491–5.
75. Bihl F, Pecheur J, Bréart B, Poupon G, Cazareth J, Julia V, et al. Primed antigen-specific CD4+ T cells are required for NK cell activation in vivo upon *Leishmania major* infection. *J Immunol* (2010) **190**(185):2174–81. doi:10.4049/jimmunol.1001486
76. Granucci F, Zanon I, Pavelka N, Dommelen SLH, van Andoniu CE, Belardelli F, et al. A contribution of mouse dendritic cell-derived IL-2 for NK cell activation. *J Exp Med* (2004) **200**:287–95. doi:10.1084/jem.20040370
77. Gasteiger G, Hemmers S, Firth MA, Floc'h AL, Huse M, Sun JC, et al. IL-2-dependent tuning of NK cell sensitivity for target cells is controlled by regulatory T cells. *J Exp Med* (2013) **210**:5460. doi:10.1084/jem.20122462
78. Sitrin J, Ring A, Garcia KC, Benoist C, Mathis D. Regulatory T cells control NK cells in an insulinitis lesion by depriving them of IL-2. *J Exp Med* (2013) **210**:2260. doi:10.1084/jem.20122248
79. Ni J, Miller M, Stojanovic A, Garbi N, Cerwenka A. Sustained effector function of IL-12/15/18-preactivated NK cells against established tumors. *J Exp Med* (2012) **209**:2351–65. doi:10.1084/jem.20120944
80. Gasteiger G, Hemmers S, Bos PD, Sun JC, Rudensky AY. IL-2-dependent adaptive control of NK cell homeostasis. *J Exp Med* (2013) **210**:119. doi:10.1084/jem.20122571
81. Lee S-H, Fragoso MF, Biron CA. Cutting edge: a novel mechanism bridging innate and adaptive immunity: IL-12 induction of CD25 to form high-affinity IL-2 receptors on NK cells. *J Immunol* (2012) **190**(189):2712–6. doi:10.4049/jimmunol.1201528
82. Ozaki K, Kikly K, Michalovich D, Young PR, Leonard WJ. Cloning of a type I cytokine receptor most related to the IL-2 receptor β chain. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2000) **97**:11439–44. doi:10.1073/pnas.200360997
83. Parrish-Novak J, Dillon SR, Nelson A, Hammond A, Sprecher C, Gross JA, et al. Interleukin 21 and its receptor are involved in NK cell expansion and regulation of lymphocyte function. *Nature* (2000) **408**:57–63. doi:10.1038/35040504
84. Kasaian MT, Whitters MJ, Carter LL, Lowe LD, Jussif JM, Deng B, et al. IL-21 limits NK cell responses and promotes antigen-specific T cell activation: a mediator of the transition from innate to adaptive immunity. *Immunity* (2002) **16**:559–69. doi:10.1016/S1074-7613(02)00295-9
85. Brady J, Hayakawa Y, Smyth MJ, Nutt SL. IL-21 induces the functional maturation of murine NK cells. *J Immunol* (2004) **172**:2048–58.
86. Brady J, Carotta S, Thong RPL, Chan CJ, Hayakawa Y, Smyth MJ, et al. The interactions of multiple cytokines control NK cell maturation. *J Immunol* (2010) **185**:6679–88. doi:10.4049/jimmunol.0903354
87. Strengell M, Matikainen S, Sirén J, Lehtonen A, Foster D, Julkunen I, et al. IL-21 in synergy with IL-15 or IL-18 enhances IFN-γ production in human NK and T cells. *J Immunol* (2003) **170**:5464–9.
88. Elsaesser H, Sauer K, Brooks DG. IL-21 is required to control chronic viral infection. *Science* (2009) **324**:1569–72. doi:10.1126/science.1174182
89. Fröhlich A, Kiselow J, Schmitz I, Freigang S, Shamshiev AT, Weber J, et al. IL-21R on T cells is critical for sustained functionality and control of chronic viral infection. *Science* (2009) **324**:1576–80. doi:10.1126/science.1172815
90. Yi JS, Du M, Zajac AJ. A vital role for interleukin-21 in the control of a chronic viral infection. *Science* (2009) **324**:1572–6. doi:10.1126/science.1175194
91. Schmitz I, Schneider C, Fröhlich A, Frebel H, Christ D, Leonard WJ, et al. IL-21 restricts virus-driven Treg cell expansion in chronic LCMV infection. *PLoS Pathog* (2013) **9**:e1003362. doi:10.1371/journal.ppat.1003362
92. Iannello A, Boulassel M-R, Samarani S, Tremblay C, Toma E, Routy J-P, et al. IL-21 enhances NK cell functions and survival in healthy and HIV-infected patients with minimal stimulation of viral replication. *J Leukoc Biol* (2010) **87**:857–67. doi:10.1189/jlb.1009701
93. Strbo N, de Armas L, Liu H, Kolber MA, Lichtenheld M, Pahwa S. IL-21 augments natural killer effector functions in chronically HIV-infected individuals. *AIDS* (2008) **22**:1551–60. doi:10.1097/QAD.0b013e3283089367
94. Freedden-Jeffrey U, von Vieira P, Lucian LA, McNeil T, Burdach SE, Murray R. Lymphopenia in interleukin (IL)-7 gene-deleted mice identifies IL-7 as a nonredundant cytokine. *J Exp Med* (1995) **181**:1519–26. doi:10.1084/jem.181.4.1519
95. He YW, Malek TR. Interleukin-7 receptor alpha is essential for the development of gamma delta + T cells, but not natural killer cells. *J Exp Med* (1996) **184**:289–93. doi:10.1084/jem.184.1.289
96. Rochman Y, Leonard WJ. The role of thymic stromal lymphopoietin in CD8+ T cell homeostasis. *J Immunol* (2008) **181**:7699–705.
97. Voshenrich CAJ, Garcia-Ojeda ME, Samson-Villégier SI, Pasqualetto V, Enault L, Goff OR-L, et al. A thymic pathway of mouse natural killer cell development characterized by expression of GATA-3 and CD127. *Nat Immunol* (2006) **7**:1217–24. doi:10.1038/ni1395
98. Marcenaro E, Della Chiesa M, Bellora F, Parolini S, Millo R, Moretta L, et al. IL-12 or IL-4 prime human NK cells to mediate functionally divergent interactions with dendritic cells or tumors. *J Immunol* (2005) **190**(174):3992–8.
99. Agaugué S, Marcenaro E, Ferranti B, Moretta L, Moretta A. Human natural killer cells exposed to IL-2, IL-12, IL-18, or IL-4 differently modulate priming of naive T cells by monocyte-derived dendritic cells. *Blood* (2008) **112**:1776–83. doi:10.1182/blood-2008-02-135871
100. Marçais A, Tomkowiak M, Walzer T, Coupet C-A, Ravel-Chapuis A, Marvel J. Maintenance of CCL5 mRNA stores by post-effector and memory CD8 T cells is dependent on transcription and is coupled to increased mRNA stability. *Eur J Immunol* (2006) **36**:2745–54. doi:10.1002/eji.200636259
101. Marçais A, Coupet C-A, Walzer T, Tomkowiak M, Ghittoni R, Marvel J. Cell-autonomous CCL5 transcription by memory CD8 T cells is regulated by IL-4. *J Immunol* (2006) **177**:4451–7.
102. Ventre E, Brinza L, Schicklin S, Mafille J, Coupet C-A, Marçais A, et al. Negative regulation of NKG2D expression by IL-4 in memory CD8 T cells. *J Immunol* (2012) **189**:3480–9. doi:10.4049/jimmunol.1102954
103. Lee YJ, Jameson SC, Hogquist KA. Alternative memory in the CD8 T cell lineage. *Trends Immunol* (2011) **32**:50–6. doi:10.1016/j.it.2010.12.004
104. Weinreich MA, Odumade OA, Jameson SC, Hogquist KA. T cells expressing the transcription factor PLZF regulate the development of memory-like CD8+ T cells. *Nat Immunol* (2010) **11**:709–16. doi:10.1038/ni.1898



105. Morris SC, Heidorn SM, Herbert DR, Perkins C, Hildeman DA, Khodoun MV, et al. Endogenously produced IL-4 nonredundantly stimulates CD8+ T cell proliferation. *J Immunol* (2009) **182**:1429–38.
106. Vignali DAA, Kuchroo VK. IL-12 family cytokines: immunological playmakers. *Nat Immunol* (2012) **13**:722–8. doi:10.1038/ni.2366
107. Kobayashi M, Fitz L, Ryan M, Hewick RM, Clark SC, Chan S, et al. Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor (NKSF), a cytokine with multiple biologic effects on human lymphocytes. *J Exp Med* (1989) **170**:827–45. doi:10.1084/jem.170.3.827
108. Hyodo Y, Matsui K, Hayashi N, Tsutsui H, Kashiwamura S, Yamauchi H, et al. IL-18 Up-regulates perforin-mediated NK activity without increasing perforin messenger RNA expression by binding to constitutively expressed IL-18 receptor. *J Immunol* (1999) **162**:1662–8.
109. Cella M, Scheidegger D, Palmer-Lehmann K, Lane P, Lanzavecchia A, Alber G. Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation. *J Exp Med* (1996) **184**:747–52. doi:10.1084/jem.184.2.747
110. Macatonia SE, Hosken NA, Litton M, Vieira P, Hsieh CS, Culpepper JA, et al. Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of Th1 cells from naive CD4+ T cells. *J Immunol* (1995) **154**:5071–9.
111. Hsieh CS, Macatonia SE, Tripp CS, Wolf SF, O'Garra A, Murphy KM. Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by *Listeria*-induced macrophages. *Science* (1993) **260**:547–9. doi:10.1126/science.8097338
112. Orange JS, Biron CA. Characterization of early IL-12, IFN- $\alpha$ , and TNF effects on antiviral state and NK cell responses during murine cytomegalovirus infection. *J Immunol* (1996) **156**:4746–56.
113. Sousa CRE, Hieny S, Schariton-Kersten T, Jankovic D, Charest H, Germain RN, et al. In vivo microbial stimulation induces rapid CD40 ligand-independent production of interleukin 12 by dendritic cells and their redistribution to T cell areas. *J Exp Med* (1997) **186**:1819–29. doi:10.1084/jem.186.11.1819
114. Goldszmid RS, Caspar P, Rivollier A, White S, Dzutsev A, Hieny S, et al. NK cell-derived interferon- $\gamma$ ; orchestrates cellular dynamics and the differentiation of monocytes into dendritic cells at the site of infection. *Immunity* (2012) **36**:1047–59. doi:10.1016/j.immuni.2012.03.026
115. Ma X, Chow JM, Gri G, Carra G, Gerosa F, Wolf SF, et al. The interleukin 12 p40 gene promoter is primed by interferon gamma in monocytic cells. *J Exp Med* (1996) **183**:147–57. doi:10.1084/jem.183.1.147
116. Mailliard RB, Son Y-I, Redlinger R, Coates PT, Giermasz A, Morel PA, et al. Dendritic cells mediate NK cell help for Th1 and CTL responses: two-signal requirement for the induction of NK cell helper function. *J Immunol* (2003) **171**:2366–73.
117. Kuwajima S, Sato T, Ishida K, Tada H, Tezuka H, Ohteki T. Interleukin 15-dependent crosstalk between conventional and plasmacytoid dendritic cells is essential for CpG-induced immune activation. *Nat Immunol* (2006) **7**:740–6. doi:10.1038/ni1348
118. Borg C, Jalil A, Laderach D, Maruyama K, Wakasugi H, Charrier S, et al. NK cell activation by dendritic cells (DCs) requires the formation of a synapse leading to IL-12 polarization in DCs. *Blood* (2004) **104**:3267–75. doi:10.1182/blood-2004-01-0380
119. Bacon CM, McVicar DW, Ortaldo JR, Rees RC, O'Shea JJ, Johnston JA. Interleukin 12 (IL-12) induces tyrosine phosphorylation of JAK2 and TYK2: differential use of Janus family tyrosine kinases by IL-2 and IL-12. *J Exp Med* (1995) **181**:399–404. doi:10.1084/jem.181.1.399
120. Jacobson NG, Szabo SJ, Weber-Nordt RM, Zhong Z, Schreiber RD, Darnell JE, et al. Interleukin 12 signaling in T helper type 1 (Th1) cells involves tyrosine phosphorylation of signal transducer and activator of transcription (Stat)3 and Stat4. *J Exp Med* (1995) **181**:1755–62. doi:10.1084/jem.181.5.1755
121. Shimoda K, Kato K, Aoki K, Matsuda T, Miyamoto A, Shibamori M, et al. Tyk2 plays a restricted role in IFN $\alpha$  signaling, although it is required for IL-12-mediated T cell function. *Immunity* (2000) **13**:561–71. doi:10.1016/S1074-7613(00)00055-8
122. Page KM, Chaudhary D, Goldman SJ, Kasaian MT. Natural killer cells from protein kinase C  $\theta^{-/-}$  mice stimulated with interleukin-12 are deficient in production of interferon- $\gamma$ . *J Leukoc Biol* (2008) **83**:1267–76. doi:10.1189/jlb.1107745
123. Orange JS, Wang B, Terhorst C, Biron CA. Requirement for natural killer cell-produced interferon gamma in defense against murine cytomegalovirus infection and enhancement of this defense pathway by interleukin 12 administration. *J Exp Med* (1995) **182**:1045–56. doi:10.1084/jem.182.4.1045
124. Kang S-J, Liang H-E, Reizis B, Locksley RM. Regulation of hierarchical clustering and activation of innate immune cells by dendritic cells. *Immunity* (2008) **29**:819–33. doi:10.1016/j.immuni.2008.09.017
125. Andrews DM, Scalzo AA, Yokoyama WM, Smyth MJ, Degli-Esposti MA. Functional interactions between dendritic cells and NK cells during viral infection. *Nat Immunol* (2003) **4**:175–81. doi:10.1038/ni880
126. Sun JC, Madera S, Bezman NA, Beilke JN, Kaplan MH, Lanier LL. Froinflammatory cytokine signaling required for the generation of natural killer cell memory. *J Exp Med* (2012) **209**:947–54. doi:10.1084/jem.20111760
127. Haeberlein S, Sebald H, Bogdan C, Schleicher U. IL-18, but not IL-15, contributes to the IL-12-dependent induction of NK-cell effector functions by *Leishmania infantum* in vivo. *Eur J Immunol* (2010) **40**:1708–17. doi:10.1002/eji.200939988
128. Sun JC, Ma A, Lanier LL. Cutting edge: IL-15-independent NK cell response to mouse cytomegalovirus infection. *J Immunol* (2009) **183**:2911–4. doi:10.4049/jimmunol.0901872
129. French AR, Sjölin H, Kim S, Koka R, Yang L, Young DA, et al. DAP12 signaling directly augments proliferative cytokine stimulation of NK cells during viral infections. *J Immunol* (2006) **177**:4981–90.
130. Chan SH, Kobayashi M, Santoli D, Perussia B, Trinchieri G. Mechanisms of IFN- $\gamma$  induction by natural killer cell stimulatory factor (NKSF/IL-12). Role of transcription and mRNA stability in the synergistic interaction between NKSF and IL-2. *J Immunol* (1992) **148**:92–8.
131. Ogilvie RL, SternJohn JR, Rattenbacher B, Vlasova IA, Williams DA, Hau HH, et al. Tristetraprolin mediates interferon- $\gamma$  mRNA decay. *J Biol Chem* (2009) **284**:11216–23. doi:10.1074/jbc.M901229200
132. Steiner DF, Thomas MF, Hu JK, Yang Z, Babiarz JE, Allen CDC, et al. MicroRNA-29 regulates T-box transcription factors and interferon- $\gamma$ ; production in helper T cells. *Immunity* (2011) **35**(2):169–81. doi:10.1016/j.immuni.2011.07.009
133. Mavropoulos A, Sully G, Cope AP, Clark AR. Stabilization of IFN- $\gamma$  mRNA by MAPK p38 in IL-12- and IL-18-stimulated human NK cells. *Blood* (2005) **105**:282–8. doi:10.1182/blood-2004-07-2782
134. Robinson D, Shibuya K, Mui A, Zonin F, Murphy E, Sana T, et al. IGIF does not drive Th1 development but synergizes with IL-12 for interferon- $\gamma$  production and activates IRAK and NF $\kappa$ B. *Immunity* (1997) **7**:571–81. doi:10.1016/S1074-7613(00)80378-7
135. Berg RE, Crossley E, Murray S, Forman J. Relative contributions of NK and CD8 T cells to IFN- $\gamma$  mediated innate immune protection against *Listeria monocytogenes*. *J Immunol* (2005) **175**:1751–7.
136. Cooper MA, Elliott JM, Keyel PA, Yang L, Carrero JA, Yokoyama WM. Cytokine-induced memory-like natural killer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2009) **106**:1915–9. doi:10.1073/pnas.0813192106
137. O'Leary JG, Goodarzi M, Drayton DL, von Andrian UH. T cell- and B cell-independent adaptive immunity mediated by natural killer cells. *Nat Immunol* (2006) **7**:507–16. doi:10.1038/ni1332
138. Okamura H, Tsutsui H, Komatsu T, Yutsudo M, Hakura A, Tanimoto T, et al. Cloning of a new cytokine that induces IFN- $\gamma$  production by T cells. *Nature* (1998) **378**:88–91. doi:10.1038/378088a0
139. Takeda K, Tsutsui H, Yoshimoto T, Adachi O, Yoshida N, Kishimoto T, et al. Defective NK cell activity and Th1 response in IL-18-deficient mice. *Immunity* (1998) **8**:383–90. doi:10.1016/S1074-7613(00)80543-9
140. Wang Y, Chaudhri G, Jackson RJ, Karupiah G. IL-12p40 and IL-18 play pivotal roles in orchestrating the cell-mediated immune response to a poxvirus infection. *J Immunol* (2009) **183**:3324–31. doi:10.4049/jimmunol.0803985
141. Wei X, Leung BP, Niedbala W, Piedrafita D, Feng G, Sweet M, et al. Altered immune responses and susceptibility to *Leishmania major* and *Staphylococcus aureus* infection in IL-18-deficient mice. *J Immunol* (1999) **163**:2821–8.
142. Sims JE, Smith DE. The IL-1 family: regulators of immunity. *Nat Rev Immunol* (2010) **10**:89–102. doi:10.1038/nri2691
143. Gracie JA, Robertson SE, McInnes IB. Interleukin-18. *J Leukoc Biol* (2003) **73**:213–24. doi:10.1189/jlb.0602313
144. Ghayur T, Banerjee S, Hugunin M, Butler D, Herzog L, Carter A, et al. Caspase-1 processes IFN- $\gamma$ -inducing factor and regulates LPS-induced IFN- $\gamma$  production. *Nature* (1997) **386**:619–23. doi:10.1038/386619a0
145. Gu Y, Kuida K, Tsutsui H, Ku G, Hsiao K, Fleming MA, et al. Activation of interferon- $\gamma$  inducing factor mediated by interleukin-1 $\beta$  converting enzyme. *Science* (1997) **275**:206–9. doi:10.1126/science.275.5297.206



146. Bossaller L, Chiang P-I, Schmidt-Lauber C, Ganesan S, Kaiser WJ, Rathinam VAK, et al. Cutting edge: FAS (CD95) mediates noncanonical IL-1 $\beta$  and IL-18 maturation via caspase-8 in an RIP3-independent manner. *J Immunol* (2012) **195**(189):5508–12. doi:10.4049/jimmunol.1202121
147. Pierini R, Perret M, Djebali S, Juruj C, Michallet M-C, Förster I, et al. ASC controls IFN- $\gamma$  levels in an IL-18-dependent manner in caspase-1-deficient mice infected with *Francisella novicida*. *J Immunol* (2013) **195**(191):3847–57. doi:10.4049/jimmunol.1203326
148. Sugawara S, Uehara A, Nochi T, Yamaguchi T, Ueda H, Sugiyama A, et al. Neutrophil proteinase 3-mediated induction of bioactive IL-18 secretor by human oral epithelial cells. *J Immunol* (2001) **195**(167):6568–75.
149. Omoto Y, Yamanaka K, Tokime K, Kitano S, Kakeda M, Akeda T, et al. Granzyme B is a novel interleukin-18 converting enzyme. *J Dermatol Sci* (2010) **59**:129–35. doi:10.1016/j.jdermsci.2010.05.004
150. Kastenmüller W, Torabi-Parizi P, Subramanian N, Lämmermann T, Germain RN. A spatially-organized multicellular innate immune response in lymph nodes limits systemic pathogen spread. *Cell* (2012) **150**:1235–48. doi:10.1016/j.cell.2012.07.021
151. Oertli M, Sundquist M, Hitzler I, Engler DB, Arnold IC, Reuter S, et al. DC-derived IL-18 drives Treg differentiation, murine *Helicobacter pylori*-specific immune tolerance, and asthma protection. *J Clin Invest* (2012) **122**:1082–96. doi:10.1172/JCI61029
152. Spörri R, Joller N, Hilbi H, Oxenius A. A novel role for neutrophils as critical activators of NK cells. *J Immunol* (2008) **181**:7121–30.
153. Pizarro TT, Michie MH, Bentz M, Woratanadham J, Smith MF Jr, Foley E, et al. IL-18, a novel immunoregulatory cytokine, is up-regulated in Crohn's disease: expression and localization in intestinal mucosal cells. *J Immunol* (1999) **195**(162):6829–35.
154. Carta S, Laveri R, Rubartelli A. Different members of the IL-1 family come out in different ways: DAMPs vs. cytokines? *Front Immunol* (2013) **4**:123. doi:10.3389/fimmu.2013.00123
155. Bellora F, Castriconi R, Dondero A, Reggiardo G, Moretta L, Mantovani A, et al. The interaction of human natural killer cells with either unpolarized or polarized macrophages results in different functional outcomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2010) **107**:21659–64. doi:10.1073/pnas.1007654108
156. Gerosa F, Baldani-Guerra B, Nisii C, Marchesini V, Carra G, Trinchieri G. Reciprocal activating interaction between natural killer cells and dendritic cells. *J Exp Med* (2002) **195**:327–33. doi:10.1084/jem.20010938
157. Humann J, Lenz LL. Activation of naive NK cells in response to *Listeria monocytogenes* requires IL-18 and contact with infected dendritic cells. *J Immunol* (2010) **195**(184):5172–8. doi:10.4049/jimmunol.0903759
158. Lapaque N, Walzer T, Méresse S, Vivier E, Trowsdale J. Interactions between human NK cells and macrophages in response to Salmonella infection. *J Immunol* (2009) **195**(182):4339–48. doi:10.4049/jimmunol.0803329
159. Piccoli D, Sbrana S, Melandri E, Valiante NM. Contact-dependent stimulation and inhibition of dendritic cells by natural killer cells. *J Exp Med* (2002) **195**:335–41. doi:10.1084/jem.20010934
160. Semino C, Angelini G, Poggi A, Rubartelli A. NK/iDC interaction results in IL-18 secretion by DCs at the synaptic cleft followed by NK cell activation and release of the DC maturation factor HMGB1. *Blood* (2005) **106**:609–16. doi:10.1182/blood-2004-10-3906
161. Bellora F, Castriconi R, Doni A, Cantoni C, Moretta L, Mantovani A, et al. M-CSF induces the expression of a membrane-bound form of IL-18 in a subset of human monocytes differentiating in vitro toward macrophages. *Eur J Immunol* (2012) **42**:1618–26. doi:10.1002/eji.201142173
162. Novick D, Kim S-H, Fantuzzi G, Reznikov LL, Dinarello CA, Rubinstein M. Interleukin-18 binding protein: a novel modulator of the Th1 cytokine response. *Immunity* (1999) **10**:127–36. doi:10.1016/S1074-7613(00)80013-8
163. Hoshino K, Tsutsui H, Kawai T, Takeda K, Nakanishi K, Takeda Y, et al. Cutting edge: generation of IL-18 receptor-deficient mice: evidence for IL-1 receptor-related protein as an essential IL-18 binding receptor. *J Immunol* (1999) **162**:5041–4.
164. Suzuki N, Chen N-J, Millar DG, Suzuki S, Horacek T, Hara H, et al. IL-1 receptor-associated kinase 4 is essential for IL-18-mediated NK and Th1 cell responses. *J Immunol* (2003) **170**:4031–5.
165. Rowland CA, Lertmengkolkhai G, Bancroft A, Haque A, Lever MS, Griffin KF, et al. Critical role of type 1 cytokines in controlling initial infection with *Burkholderia mallei*. *Infect Immun* (2006) **74**:5333–40. doi:10.1128/IAI.02046-05
166. Kawakami K, Koguchi Y, Qureshi MH, Miyazato A, Yara S, Kinjo Y, et al. IL-18 contributes to host resistance against infection with *Cryptococcus neoformans* in mice with defective IL-12 synthesis through induction of IFN- $\gamma$  production by NK cells. *J Immunol* (2000) **195**(165):941–7.
167. Pien GC, Satoskar AR, Takeda K, Akira S, Biron CA. Cutting edge: selective IL-18 requirements for induction of compartmental IFN- $\gamma$  responses during viral infection. *J Immunol* (2000) **195**(165):4787–91.
168. Chaix J, Tessmer MS, Hoebe K, Fuséri N, Ryffel B, Dalod M, et al. Cutting edge: priming of NK cells by IL-18. *J Immunol* (2008) **195**(181):1627–31.
169. Mailliard RB, Alber SM, Shen H, Watkins SC, Kirkwood JM, Herberman RB, et al. IL-18-induced CD83+CCR7+ NK helper cells. *J Exp Med* (2005) **202**:941–53. doi:10.1084/jem.20050128
170. Schulthess J, Meresse B, Ramiro-Puig E, Montcuquet N, Darche S, Bègue B, et al. Interleukin-15-dependent NKp46+ innate lymphoid cells control intestinal inflammation by recruiting inflammatory monocytes. *Immunity* (2012) **37**(1):108–21. doi:10.1016/j.immuni.2012.05.013
171. Terme M, Ullrich E, Aymeric L, Meinhardt K, Coudert JD, Desbois M, et al. Cancer-induced immunosuppression: IL-18-elicited immunoablative NK cells. *Cancer Res* (2012) **72**:2757–67. doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-3379
172. Allen IC, TeKippe EM, Woodford R-MT, Uronis JM, Holl EK, Rogers AB, et al. The NLRP3 inflammasome functions as a negative regulator of tumorigenesis during colitis-associated cancer. *J Exp Med* (2010) **207**:1045–56. doi:10.1084/jem.20100050
173. Salcedo R, Worschech A, Cardone M, Jones Y, Gyulai Z, Dai R-M, et al. MyD88-mediated signaling prevents development of adenocarcinomas of the colon: role of interleukin 18. *J Exp Med* (2010) **207**:1625–36. doi:10.1084/jem.20100199
174. Wong JL, Berk E, Edwards RP, Kalinski P. IL-18-primed helper NK cells collaborate with dendritic cells to promote recruitment of effector CD8+ T cells to the tumor microenvironment. *Cancer Res* (2013) **73**:4653–62. doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-4366
175. Reading PC, Whitney PG, Barr DP, Wojtasiak M, Mintern JD, Waithman J, et al. IL-18, but not IL-12, regulates NK cell activity following intranasal herpes simplex virus type 1 infection. *J Immunol* (2007) **179**:3214–21.
176. Li MO, Wan YY, Sanjabi S, Robertson A-KL, Flavell RA. Transforming growth factor-beta regulation of immune responses. *Annu Rev Immunol* (2006) **24**:99–146. doi:10.1146/annurev.immunol.24.021605.090737
177. Weiss A, Attisano L. The TGF $\beta$  superfamily signaling pathway. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol* (2013) **2**:47–63. doi:10.1002/wdev.86
178. Ichiyama K, Sekiya T, Inoue N, Tamiya T, Kashiwagi I, Kimura A, et al. Transcription factor Smad-independent Thelper 17 cell induction by transforming growth factor- $\beta$  is mediated by suppression of cohesin. *Immunity* (2011) **34**:741–54. doi:10.1016/j.immuni.2011.02.021
179. Espevik T, Figari IS, Ranges GE, Palladino MA Jr. Transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta 1) and recombinant human tumor necrosis factor-alpha reciprocally regulate the generation of lymphokine-activated killer cell activity. Comparison between natural porcine platelet-derived TGF-beta 1 and TGF-beta 2, and recombinant human TGF-beta 1. *J Immunol* (1988) **195**(140):2312–6.
180. Grimm EA, Crump WL III, Durett A, Hester JP, Lagoo-Deenadalan S, Owen-Schaub LB. TGF-beta inhibits the in vitro induction of lymphokine-activated killing activity. *Cancer Immunol Immunother* (1988) **27**:53–8. doi:10.1007/BF00205758
181. Mulé JJ, Schwarz SL, Roberts AB, Sporn MB, Rosenberg SA. Transforming growth factor-beta inhibits the in vitro generation of lymphokine-activated killer cells and cytotoxic T cells. *Cancer Immunol Immunother* (1988) **26**:95–100.
182. Rook AH, Kehr JH, Wakefield LM, Roberts AB, Sporn MB, Burlington DB, et al. Effects of transforming growth factor beta on the functions of natural killer cells: depressed cytolytic activity and blunting of interferon responsiveness. *J Immunol* (1986) **195**(136):3916–20.
183. Wallick SC, Figari IS, Morris RE, Levinson AD, Palladino MA. Immunoregulatory role of transforming growth factor beta (TGF-beta) in development of killer cells: comparison of active and latent TGF-beta 1. *J Exp Med* (1990) **172**:1777–84. doi:10.1084/jem.172.6.1777
184. Su HC, Leite-Morris KA, Braun L, Biron CA. A role for transforming growth factor-beta 1 in regulating natural killer cell and T lymphocyte proliferative responses during acute infection with lymphocytic choriomeningitis virus. *J Immunol* (1991) **195**(147):2717–27.

185. Arteaga CL, Hurd SD, Winnier AR, Johnson MD, Fendly BM, Forbes JT. Anti-transforming growth factor (TGF)-beta antibodies inhibit breast cancer cell tumorigenicity and increase mouse spleen natural killer cell activity. Implications for a possible role of tumor cell/host TGF-beta interactions in human breast cancer progression. *J Clin Invest* (1993) **92**:2569–76.
186. Bellone G, Aste-Amezaga M, Trinchieri G, Rodeck U. Regulation of NK cell functions by TGF-beta 1. *J Immunol* (1995) **150**(155):1066–73.
187. Hunter CA, Bermudez L, Beernink H, Waegell W, Remington JS. Transforming growth factor-beta inhibits interleukin-12-induced production of interferon-gamma by natural killer cells: a role for transforming growth factor-beta in the regulation of T cell-independent resistance to *Toxoplasma gondii*. *Eur J Immunol* (1995) **25**:994–1000. doi:10.1002/eji.1830250420
188. Meadows SK, Eriksson M, Barber A, Sentman CL. Human NK cell IFN-gamma production is regulated by endogenous TGF-beta. *Int Immunopharmacol* (2006) **6**:1020–8. doi:10.1016/j.intimp.2006.01.013
189. Yu J, Wei M, Becknell B, Trotta R, Liu S, Boyd Z, et al. Pro- and anti-inflammatory cytokine signaling: reciprocal antagonism regulates interferon-gamma production by human natural killer cells. *Immunity* (2006) **24**:575–90. doi:10.1016/j.immuni.2006.03.016
190. Trotta R, Dal Col J, Yu J, Ciarlariello D, Thomas B, Zhang X, et al. TGF-beta utilizes SMAD3 to inhibit CD16-mediated IFN-gamma production and antibody-dependent cellular cytotoxicity in human NK cells. *J Immunol* (2008) **190**(181):3784–92.
191. Castriconi R, Cantoni C, Della Chiesa M, Vitale M, Marcenaro E, Conte R, et al. Transforming growth factor beta 1 inhibits expression of Nkp30 and NKG2D receptors: consequences for the NK-mediated killing of dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2003) **100**:4120–5. doi:10.1073/pnas.0730640100
192. Lee J-C, Lee K-M, Kim D-W, Heo DS. Elevated TGF-beta1 secretion and down-modulation of NKG2D underlies impaired NK cytotoxicity in cancer patients. *J Immunol* (2004) **170**(12):7335–40.
193. Castriconi R, Dondero A, Bellora F, Moretta L, Castellano A, Locatelli F, et al. Neuroblastoma-derived TGF-beta1 modulates the chemokine receptor repertoire of human resting NK cells. *J Immunol* (2013) **190**(10):5321–8. doi:10.4049/jimmunol.1202693
194. Su HC, Ishikawa R, Biron CA. Transforming growth factor-beta expression and natural killer cell responses during virus infection of normal, nude, and SCID mice. *J Immunol* (1993) **150**(151):4874–90.
195. Laouar Y, Sutterwala FS, Gorelik L, Flavell RA. Transforming growth factor-beta controls T helper type 1 cell development through regulation of natural killer cell interferon-gamma. *Nat Immunol* (2005) **6**:600–7. doi:10.1038/ni1197
196. Marcocci JB, Lim JR, Schaubert KL, Fodil-Cornu N, Matka M, McCubrey AL, et al. TGF-beta is responsible for NK cell immaturity during ontogeny and increased susceptibility to infection during mouse infancy. *Nat Immunol* (2012) **13**:843–50. doi:10.1038/ni.2388
197. Ortaldo JR, Mason AT, O'Shea JJ, Smyth MJ, Falk LA, Kennedy IC, et al. Mechanistic studies of transforming growth factor-beta inhibition of IL-2-dependent activation of CD3- large granular lymphocyte functions. Regulation of IL-2R beta (p75) signal transduction. *J Immunol* (1991) **150**(146):3791–8.
198. Fiorentino DF, Bond MW, Mosmann TR. Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J Exp Med* (1989) **170**:2081–95. doi:10.1084/jem.170.6.2081
199. Kamanaka M, Kim ST, Wan YY, Sutterwala FS, Lara-Tejero M, Galán JE, et al. Expression of interleukin-10 in intestinal lymphocytes detected by an interleukin-10 reporter Knockin tiger mouse. *Immunity* (2006) **25**:941–52. doi:10.1016/j.immuni.2006.09.013
200. Lee S-H, Kim K-S, Fodil-Cornu N, Vidal SM, Biron CA. Activating receptors promote NK cell expansion for maintenance, IL-10 production, and CD8 T cell regulation during viral infection. *J Exp Med* (2009) **206**:2235–51. doi:10.1084/jem.20082387
201. Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* (2001) **19**:683–765. doi:10.1146/annurev.immunol.19.1.683
202. Perona-Wright G, Mohrs K, Szaba FM, Kummer LW, Madan R, Karp CL, et al. Systemic but not local infections elicit immunosuppressive IL-10 production by natural killer cells. *Cell Host Microbe* (2009) **6**:503–12. doi:10.1016/j.chom.2009.11.003
203. Cai G, Kastelein RA, Hunter CA. IL-10 enhances NK cell proliferation, cytotoxicity and production of IFN-gamma when combined with IL-18. *Eur J Immunol* (1999) **29**:2658–65. doi:10.1002/(SICI)1521-4141(199909)29:09<2658::AID-IMMU2658>3.3.CO;2-7
204. Carson WE, Lindemann MJ, Baiocchi R, Linett M, Tan JC, Chou CC, et al. The functional characterization of interleukin-10 receptor expression on human natural killer cells. *Blood* (1995) **85**:3577–85.
205. Chiu B-C, Stolberg VR, Chensue SW. Mononuclear phagocyte-derived IL-10 suppresses the innate IL-12/IFN-gamma axis in lung-challenged aged mice. *J Immunol* (2008) **181**:3156–66.
206. Qian C, Jiang X, An H, Yu Y, Guo Z, Liu S, et al. TLR agonists promote ERK-mediated preferential IL-10 production of regulatory dendritic cells (dIFDCs), leading to NK-cell activation. *Blood* (2006) **108**:2307–15. doi:10.1182/blood-2006-03-005595
207. Shibata Y, Foster LA, Kurimoto M, Okamura H, Nakamura RM, Kawajiri K, et al. Immunoregulatory roles of IL-10 in innate immunity: IL-10 inhibits macrophage production of IFN-gamma-inducing factors but enhances NK cell production of IFN-gamma. *J Immunol* (1998) **161**:4283–8.
208. Lassen MG, Lukens JR, Dolina JS, Brown MG, Hahn YS. Intrahepatic IL-10 maintains NKG2A+Ly49- liver NK cells in a functionally hyporesponsive state. *J Immunol* (2010) **184**:2693–701. doi:10.4049/jimmunol.0901362
209. Stacey MA, Marsden M, Wang ECY, Wilkinson GWG, Humphreys IR. IL-10 restricts activation-induced death of NK cells during acute murine cytomegalovirus infection. *J Immunol* (2011) **187**:2944–52. doi:10.4049/jimmunol.1101021
210. Ganai SC, Sanos SL, Kallfass C, Oberle K, Johnner C, Kirschning C, et al. Priming of natural killer cells by nonmucosal mononuclear phagocytes requires instructive signals from commensal microbiota. *Immunity* (2012) **37**:171–86. doi:10.1016/j.immuni.2012.05.020
211. Gidlund MA, Orn A, Wigzell H, Senik A, Gresser I. Enhanced NK cell activity in mice injected with interferon and interferon inducers. *Nature* (1978) **273**:759–61. doi:10.1038/273759a0
212. Beuneu H, Deguine J, Bouvier I, Santo JPD, Albert ML, Bousso P. Cutting edge: a dual role for type I IFNs during polyinosinic-polycytidylic acid-induced NK cell activation. *J Immunol* (2011) **187**:2084–8. doi:10.4049/jimmunol.1004210
213. Martinez J, Huang X, Yang Y. Direct action of type I IFN on NK cells is required for their activation in response to vaccinia viral infection in vivo. *J Immunol* (2008) **180**:1592–7.

**Conflict of Interest Statement:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Received: 16 October 2013; paper pending published: 04 November 2013; accepted: 27 November 2013; published online: 12 December 2013.

Citation: Marçais A, Viel S, Grau M, Henry T, Marvel J and Walzer T (2013) Regulation of mouse NK cell development and function by cytokines. *Front. Immunol.* 4:450. doi: 10.3389/fimmu.2013.00450

This article was submitted to NK Cell Biology, a section of the journal *Frontiers in Immunology*.

Copyright © 2013 Marçais, Viel, Grau, Henry, Marvel and Walzer. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

# Methods and kits for detecting antigen-induced memory CD8<sup>+</sup> T cells

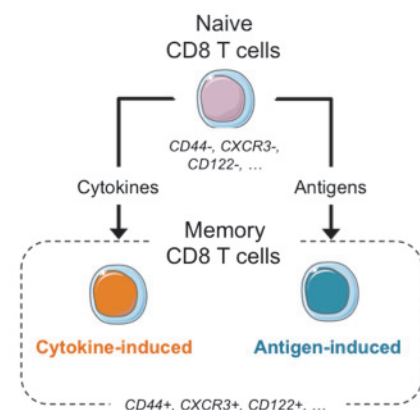
Patent EP12306646.6

## Product:

Biomarker specific of antigen-induced memory CD8 T cells

## Rationale:

Memory CD8 T cells can be generated from naive CD8 T cells either by the recognition of antigens during the primary immune response (**antigen-induced memory**), or by strong cytokine stimulation (**cytokine-induced memory**). Antigen- and cytokine-induced memory CD8 T cells express the same conventional memory markers used to distinguish memory from naive cells. Due to this heterogeneity, the precise identification of memory CD8 T cells generated against different pathogen or tumor-derived antigens is impossible.

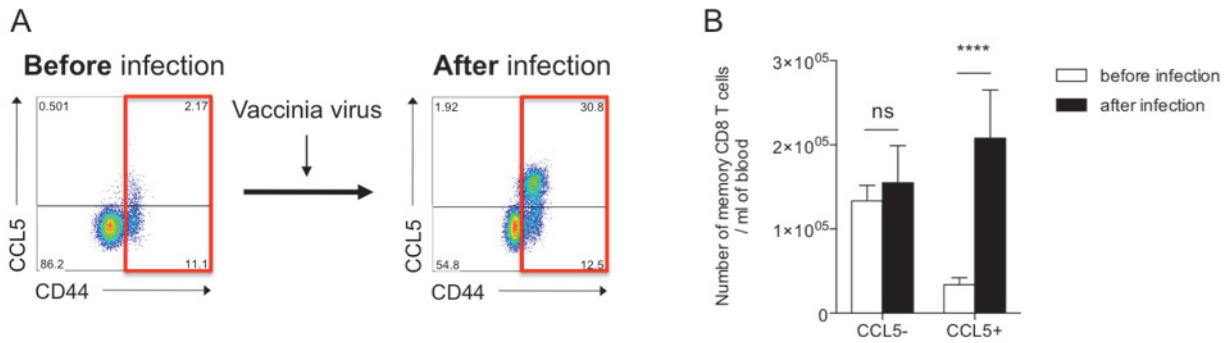


## Potential indication:

- Identification of memory CD8 T cells generated during pathogen infection, tumor development or vaccination.
- Evaluation of vaccination protocol efficiency.

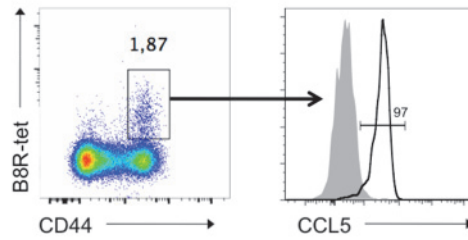


## Proof of concept:



**Figure 1: Immune response against pathogen generates CCL5+ memory CD8 T cells.**

Blood samples were collected from mice before and after (50 days) infection by Vaccinia virus. CD8 T cells were analyzed for their expression of CD44 (marker of memory cells) and CCL5 (A). In each condition, the number of memory (CD44<sup>high</sup>) CD8 T cells expressing or not CCL5 was determined (B). Mann Whitney test, ns = non significant, \*\*\*\* = pvalue < 0.0001.



**Figure 2: All B8R-specific memory CD8 T cells express CCL5.**

Memory CD8 T cells specific of the vaccinia virus epitope B8R were identified using B8R tetramer staining on splenocytes from vaccinia virus infected mice (50 days post infection). These B8R-specific memory CD8 T cells were analyzed for their expression of CCL5. Filled histogram: control isotype, open histogram: anti-mouse CCL5.



# Références bibliographiques



- Abbey, J.L., and H.C. O'Neill. 2008. Expression of T-cell receptor genes during early T-cell development. *Immunol Cell Biol.* 86:166–174. doi:10.1038/sj.icb.7100120.
- Adrain, C., B.M. Murphy, and S.J. Martin. 2005. Molecular ordering of the caspase activation cascade initiated by the cytotoxic T lymphocyte/natural killer (CTL/NK) protease granzyme B. *J. Biol. Chem.* 280:4663–4673. doi:10.1074/jbc.M410915200.
- Agarwal, P., A. Raghavan, S.L. Nandiwada, J.M. Curtsinger, P.R. Bohjanen, D.L. Mueller, and M.F. Mescher. 2009. Gene regulation and chromatin remodeling by IL-12 and type I IFN in programming for CD8 T cell effector function and memory. *J. Immunol.* 183:1695–1704. doi:10.4049/jimmunol.0900592.
- Ahn, Y.-T., B. Huang, L. McPherson, C. Clayberger, and A.M. Krensky. 2007. Dynamic interplay of transcriptional machinery and chromatin regulates “late” expression of the chemokine RANTES in T lymphocytes. *Molecular and cellular biology.* 27:253–266. doi:10.1128/MCB.01071-06.
- Aichele, P., H. Unsoeld, M. Koschella, O. Schweier, U. Kalinke, and S. Vucikuj. 2006. CD8 T cells specific for lymphocytic choriomeningitis virus require type I IFN receptor for clonal expansion. *The Journal of Immunology.* 176:4525–4529. doi:10.4049/jimmunol.176.8.4525.
- Akue, A.D., J.-Y. Lee, and S.C. Jameson. 2012. Derivation and maintenance of virtual memory CD8 T cells. *J. Immunol.* 188:2516–2523. doi:10.4049/jimmunol.1102213.
- Allan, R.S., C.M. Smith, G.T. Belz, A.L. van Lint, L.M. Wakim, W.R. Heath, and F.R. Carbone. 2003. Epidermal viral immunity induced by CD8alpha+ dendritic cells but not by Langerhans cells. *Science.* 301:1925–1928. doi:10.1126/science.1087576.
- Allan, R.S., J. Waithman, S. Bedoui, C.M. Jones, J.A. Villadangos, Y. Zhan, A.M. Lew, K. Shortman, W.R. Heath, and F.R. Carbone. 2006. Migratory dendritic cells transfer antigen to a lymph node-resident dendritic cell population for efficient CTL priming. *Immunity.* 25:153–162. doi:10.1016/j.immuni.2006.04.017.
- Alonzo, E.S., R.A. Gottschalk, J. Das, T. Egawa, R.M. Hobbs, P.P. Pandolfi, P. Pereira, K.E. Nichols, G.A. Koretzky, M.S. Jordan, and D.B. Sant'Angelo. 2010. Development of promyelocytic zinc finger and ThPOK-expressing innate gamma delta T cells is controlled by strength of TCR signaling and Id3. *J. Immunol.* 184:1268–1279. doi:10.4049/jimmunol.0903218.
- André, M.C., D. Sigurdardottir, S. Kuttruff, B. Pömmel, R. Handgretinger, H.-G. Rammensee, and A. Steinle. 2012. Impaired tumor rejection by memory CD8 T cells in mice with NKG2D dysfunction. *Int. J. Cancer.* 131:1601–1610. doi:10.1002/ijc.26191.
- Andrian, von, U.H., and C.R. Mackay. 2000. T-cell function and migration. Two sides of the same coin. *N Engl J Med.* 343:1020–1034. doi:10.1056/NEJM200010053431407.
- Appay, V., P.R. Dunbar, V. Cerundolo, A. McMichael, L. Czaplewski, and S. Rowland-Jones. 2000. RANTES activates antigen-specific cytotoxic T lymphocytes in a mitogen-like manner through cell surface aggregation. *International Immunology.* 12:1173–1182.
- Appay, V., R.A.W. van Lier, F. Sallusto, and M. Roederer. 2008. Phenotype and function of human T lymphocyte subsets: consensus and issues. *Cytometry A.* 73:975–983. doi:10.1002/cyto.a.20643.

- Araki, K., A.P. Turner, V.O. Shaffer, S. Gangappa, S.A. Keller, M.F. Bachmann, C.P. Larsen, and R. Ahmed. 2009a. mTOR regulates memory CD8 T-cell differentiation. *Nature*. 460:108–112. doi:10.1038/nature08155.
- Araki, Y., M. Fann, R. Wersto, and N.-P. Weng. 2008. Histone acetylation facilitates rapid and robust memory CD8 T cell response through differential expression of effector molecules (eomesodermin and its targets: perforin and granzyme B). *The Journal of Immunology*. 180:8102–8108. doi:10.4049/jimmunol.180.12.8102.
- Araki, Y., Z. Wang, C. Zang, W.H. Wood III, D. Schones, K. Cui, T.-Y. Roh, B. Lhotsky, R.P. Wersto, W. Peng, K.G. Becker, K. Zhao, and N.-P. Weng. 2009b. Genome-wide Analysis of Histone Methylation Reveals Chromatin State-Based Regulation of Gene Transcription and Function of Memory CD8<sup>+</sup> T Cells. *Immunity*. 30:912–925. doi:10.1016/j.immuni.2009.05.006.
- Ariotti, S., M.A. Hogenbirk, F.E. Dijkgraaf, L.L. Visser, M.E. Hoekstra, J.-Y. Song, H. Jacobs, J.B. Haanen, and T.N. Schumacher. 2014. T cell memory. Skin-resident memory CD8<sup>+</sup> T cells trigger a state of tissue-wide pathogen alert. *Science*. 346:101–105. doi:10.1126/science.1254803.
- Atherly, L.O., J.A. Lucas, M. Felices, C.C. Yin, S.L. Reiner, and L.J. Berg. 2006. The Tec Family Tyrosine Kinases Itk and Rlk Regulate the Development of Conventional CD8<sup>+</sup> T Cells. *Immunity*. 25:79–91. doi:10.1016/j.immuni.2006.05.012.
- Baba, Y., R. Pelayo, and P.W. Kincade. 2004. Relationships between hematopoietic stem cells and lymphocyte progenitors. *Trends in Immunology*. 25:645–649. doi:10.1016/j.it.2004.09.010.
- Bacon, K.B., B.A. Premack, P. Gardner, and T.J. Schall. 1995. Activation of dual T cell signaling pathways by the chemokine RANTES. *Science*. 269:1727–1730.
- Badour, K., M.K.H. McGavin, J. Zhang, S. Freeman, C. Vieira, D. Filipp, M. Julius, G.B. Mills, and K.A. Siminovitch. 2007. Interaction of the Wiskott-Aldrich syndrome protein with sorting nexin 9 is required for CD28 endocytosis and cosignaling in T cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 104:1593–1598. doi:10.1073/pnas.0610543104.
- Badovinac, V.P., and J.T. Harty. 2002. CD8(+) T-cell homeostasis after infection: setting the 'curve'. *Microbes Infect.* 4:441–447.
- Badovinac, V.P., and J.T. Harty. 2007. Manipulating the rate of memory CD8<sup>+</sup> T cell generation after acute infection. *The Journal of Immunology*. 179:53–63. doi:10.4049/jimmunol.179.1.53.
- Badovinac, V.P., B.B. Porter, and J.T. Harty. 2002. Programmed contraction of CD8(+) T cells after infection. *Nature Immunology*. 3:619–626. doi:10.1038/ni804.
- Badovinac, V.P., B.B. Porter, and J.T. Harty. 2004. CD8<sup>+</sup> T cell contraction is controlled by early inflammation. *Nature Immunology*. 5:809–817. doi:10.1038/ni1098.
- Badovinac, V.P., J.S. Haring, and J.T. Harty. 2007. Initial T cell receptor transgenic cell precursor frequency dictates critical aspects of the CD8(+) T cell response to infection. *Immunity*. 26:827–841. doi:10.1016/j.immuni.2007.04.013.
- Badovinac, V.P., K.A.N. Messingham, A. Jabbari, J.S. Haring, and J.T. Harty. 2005. Accelerated CD8<sup>+</sup> T-cell memory and prime-boost response after dendritic-cell

- vaccination. *Nat Med*. 11:748–756. doi:10.1038/nm1257.
- Bajénoff, M., J.G. Egen, L.Y. Koo, J.P. Laugier, F. Brau, N. Glaichenhaus, and R.N. Germain. 2006. Stromal cell networks regulate lymphocyte entry, migration, and territoriality in lymph nodes. *Immunity*. 25:989–1001. doi:10.1016/j.immuni.2006.10.011.
- Banerjee, A., S.M. Gordon, A.M. Intlekofer, M.A. Paley, E.C. Mooney, T. Lindsten, E.J. Wherry, and S.L. Reiner. 2010. Cutting edge: The transcription factor eomesodermin enables CD8<sup>+</sup> T cells to compete for the memory cell niche. *J. Immunol.* 185:4988–4992. doi:10.4049/jimmunol.1002042.
- Barber, D.L., E.J. Wherry, D. Masopust, B. Zhu, J.P. Allison, A.H. Sharpe, G.J. Freeman, and R. Ahmed. 2005. Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature*. 439:682–687. doi:10.1038/nature04444.
- Bassett, J.D., S.L. Swift, H. VanSeggelen, J.A. Hammill, A.J.R. McGray, C. Eveleigh, Y. Wan, and J.L. Bramson. 2012. Combined mTOR inhibition and OX40 agonism enhances CD8(+) T cell memory and protective immunity produced by recombinant adenovirus vaccines. *Mol. Ther.* 20:860–869. doi:10.1038/mt.2011.281.
- Bauer, S., V. Groh, J. Wu, A. Steinle, J.H. Phillips, L.L. Lanier, and T. Spies. 1999. Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science*. 285:727–729.
- Becker, T.C., S.M. Coley, E.J. Wherry, and R. Ahmed. 2005. Bone marrow is a preferred site for homeostatic proliferation of memory CD8 T cells. *The Journal of Immunology*. 174:1269–1273. doi:10.4049/jimmunol.174.3.1269.
- Belz, G.T., C.M. Smith, D. Eichner, K. Shortman, G. Karupiah, F.R. Carbone, and W.R. Heath. 2004. Cutting edge: conventional CD8 alpha<sup>+</sup> dendritic cells are generally involved in priming CTL immunity to viruses. *The Journal of Immunology*. 172:1996–2000. doi:10.4049/jimmunol.172.4.1996.
- Bennett, S.R., F.R. Carbone, F. Karamalis, R.A. Flavell, J.F. Miller, and W.R. Heath. 1998. Help for cytotoxic-T-cell responses is mediated by CD40 signalling. *Nature*. 393:478–480. doi:10.1038/30996.
- Berg, R.E., C.J. Cordes, and J. Forman. 2002. Contribution of CD8<sup>+</sup> T cells to innate immunity: IFN-gamma secretion induced by IL-12 and IL-18. *Eur. J. Immunol.* 32:2807–2816. doi:10.1002/1521-4141(200210)32:10<2807::AID-IMMU2807>3.0.CO;2-0.
- Berg, R.E., E. Crossley, S. Murray, and J. Forman. 2003. Memory CD8<sup>+</sup> T cells provide innate immune protection against *Listeria monocytogenes* in the absence of cognate antigen. *Journal of Experimental Medicine*. 198:1583–1593. doi:10.1084/jem.20031051.
- Bergsbaken, T., and M.J. Bevan. 2015. Proinflammatory microenvironments within the intestine regulate the differentiation of tissue-resident CD8<sup>+</sup> T cells responding to infection. *Nature Publishing Group*. 16:406–414. doi:10.1038/ni.3108.
- Berlin, C., E.L. Berg, M.J. Briskin, D.P. Andrew, P.J. Kilshaw, B. Holzmann, I.L. Weissman, A. Hamann, and E.C. Butcher. 1993. Alpha 4 beta 7 integrin mediates lymphocyte binding to the mucosal vascular addressin MAdCAM-1. *Cell*. 74:185–195.
- Bertram, E.M., A. Tafuri, A. Shahinian, V.S.F. Chan, L. Hunziker, M. Recher, P.S. Ohashi, T.W. Mak, and T.H. Watts. 2002. Role of ICOS versus CD28 in antiviral immunity. *Eur.*

*J. Immunol.* 32:3376–3385. doi:10.1002/1521-4141(200212)32:12<3376::AID-IMMU3376>3.0.CO;2-Y.

- Blattman, J.N., R. Antia, D.J.D. Sourdive, X. Wang, S.M. Kaech, K. Murali-Krishna, J.D. Altman, and R. Ahmed. 2002. Estimating the precursor frequency of naive antigen-specific CD8 T cells. *Journal of Experimental Medicine*. 195:657–664.
- Boulet, S., J.-F. Daudelin, and N. Labrecque. 2014. IL-2 induction of Blimp-1 is a key in vivo signal for CD8+ short-lived effector T cell differentiation. *J. Immunol.* 193:1847–1854. doi:10.4049/jimmunol.1302365.
- Bousso, P., and E. Robey. 2003. Dynamics of CD8+ T cell priming by dendritic cells in intact lymph nodes. *Nature Immunology*. 4:579–585. doi:10.1038/ni928.
- Boyman, O., and J. Sprent. 2012. The role of interleukin-2 during homeostasis and activation of the immune system. *Nat Rev Immunol.* 12:180–190. doi:10.1038/nri3156.
- Boyman, O., C. Ramsey, D.M. Kim, J. Sprent, and C.D. Surh. 2008. IL-7/anti-IL-7 mAb complexes restore T cell development and induce homeostatic T Cell expansion without lymphopenia. *The Journal of Immunology*. 180:7265–7275. doi:10.4049/jimmunol.180.11.7265.
- Boyman, O., M. Kovar, M.P. Rubinstein, C.D. Surh, and J. Sprent. 2006. Selective stimulation of T cell subsets with antibody-cytokine immune complexes. *Science*. 311:1924–1927. doi:10.1126/science.1122927.
- Böttcher, J.P., M. Beyer, F. Meissner, Z. Abdullah, J. Sander, B. Höchst, S. Eickhoff, J.C. Rieckmann, C. Russo, T. Bauer, T. Flecken, D. Giesen, D. Engel, S. Jung, D.H. Busch, U. Protzer, R. Thimme, M. Mann, C. Kurts, J.L. Schultze, W. Kastenmüller, and P.A. Knolle. 2015. Functional classification of memory CD8(+) T cells by CX3CR1 expression. *Nature Communications*. 6:8306. doi:10.1038/ncomms9306.
- Breitfeld, D., L. Ohl, E. Kremmer, J. Ellwart, F. Sallusto, M. Lipp, and R. Förster. 2000. Follicular B helper T cells express CXC chemokine receptor 5, localize to B cell follicles, and support immunoglobulin production. *Journal of Experimental Medicine*. 192:1545–1552.
- Brincks, E.L., A. Katewa, T.A. Kucaba, T.S. Griffith, and K.L. Legge. 2008. CD8 T cells utilize TRAIL to control influenza virus infection. *J. Immunol.* 181:4918–4925. doi:10.4049/jimmunol.181.7.4918.
- Bromley, S.K., S.Y. Thomas, and A.D. Luster. 2005. Chemokine receptor CCR7 guides T cell exit from peripheral tissues and entry into afferent lymphatics. *Nature Immunology*. 6:895–901. doi:10.1038/ni1240.
- Bromley, S.K., T.R. Mempel, and A.D. Luster. 2008. Orchestrating the orchestrators: chemokines in control of T cell traffic. *Nature Publishing Group*. 9:970–980. doi:10.1038/ni.f.213.
- Broussard, C., C. Fleischacker, C. Fleishecker, R. Horai, M. Chetana, A.M. Venegas, L.L. Sharp, S.M. Hedrick, B.J. Fowlkes, and P.L. Schwartzberg. 2006. Altered development of CD8+ T cell lineages in mice deficient for the Tec kinases Itk and Rlk. *Immunity*. 25:93–104. doi:10.1016/j.immuni.2006.05.011.
- Brownlie, R.J., and R. Zamoyska. 2013. T cell receptor signalling networks: branched,

- diversified and bounded. *Nat Rev Immunol*. 13:257–269. doi:10.1038/nri3403.
- Burr, J.S., N.D. Savage, G.E. Messah, S.L. Kimzey, A.S. Shaw, R.H. Arch, and J.M. Green. 2001. Cutting edge: distinct motifs within CD28 regulate T cell proliferation and induction of Bcl-XL. *The Journal of Immunology*. 166:5331–5335. doi:10.4049/jimmunol.166.9.5331.
- Campanella, G.S.V., B.D. Medoff, L.A. Manice, R.A. Colvin, and A.D. Luster. 2008. Development of a novel chemokine-mediated in vivo T cell recruitment assay. *J. Immunol. Methods*. 331:127–139. doi:10.1016/j.jim.2007.12.002.
- Cannarile, M.A., N.A. Lind, R. Rivera, A.D. Sheridan, K.A. Camfield, B.B. Wu, K.P. Cheung, Z. Ding, and A.W. Goldrath. 2006. Transcriptional regulator Id2 mediates CD8+ T cell immunity. *Nature Immunology*. 7:1317–1325. doi:10.1038/ni1403.
- Carty, S.A., G.A. Koretzky, and M.S. Jordan. 2014. Interleukin-4 regulates eomesodermin in CD8+ T cell development and differentiation. *PLoS ONE*. 9:e106659. doi:10.1371/journal.pone.0106659.
- Casey, K.A., K.A. Fraser, J.M. Schenkel, A. Moran, M.C. Abt, L.K. Beura, P.J. Lucas, D. Artis, E.J. Wherry, K. Hogquist, V. Vezys, and D. Masopust. 2012. Antigen-independent differentiation and maintenance of effector-like resident memory T cells in tissues. *J. Immunol*. 188:4866–4875. doi:10.4049/jimmunol.1200402.
- Castellino, F., A.Y. Huang, G. Altan-Bonnet, S. Stoll, C. Scheinecker, and R.N. Germain. 2006. Chemokines enhance immunity by guiding naive CD8+ T cells to sites of CD4+ T cell-dendritic cell interaction. *Nature*. 440:890–895. doi:10.1038/nature04651.
- Castellino, F., and R.N. Germain. 2007. Chemokine-guided CD4+ T cell help enhances generation of IL-6RalphahighIL-7Ralpha high prememory CD8+ T cells. *The Journal of Immunology*. 178:778–787. doi:10.4049/jimmunol.178.2.778.
- Catalfamo, M., T. Karpova, J. McNally, S.V. Costes, S.J. Lockett, E. Bos, P.J. Peters, and P.A. Henkart. 2004. Human CD8+ T cells store RANTES in a unique secretory compartment and release it rapidly after TcR stimulation. *Immunity*. 20:219–230.
- Chaix, J., S.A. Nish, W.-H.W. Lin, N.J. Rothman, L. Ding, E.J. Wherry, and S.L. Reiner. 2014. Cutting edge: CXCR4 is critical for CD8+ memory T cell homeostatic self-renewal but not rechallenge self-renewal. *J. Immunol*. 193:1013–1016. doi:10.4049/jimmunol.1400488.
- Chang, J.T., M.L. Ciocca, I. Kinjyo, V.R. Palanivel, C.E. McClurkin, C.S. DeJong, E.C. Mooney, J.S. Kim, N.C. Steinell, J. Oliaro, C.C. Yin, B.I. Florea, H.S. Overkleeft, L.J. Berg, S.M. Russell, G.A. Koretzky, M.S. Jordan, and S.L. Reiner. 2011. Asymmetric proteasome segregation as a mechanism for unequal partitioning of the transcription factor T-bet during T lymphocyte division. *Immunity*. 34:492–504. doi:10.1016/j.immuni.2011.03.017.
- Chang, J.T., V.R. Palanivel, I. Kinjyo, F. Schambach, A.M. Intlekofer, A. Banerjee, S.A. Longworth, K.E. Vinup, P. Mrass, J. Oliaro, N. Killeen, J.S. Orange, S.M. Russell, W. Weninger, and S.L. Reiner. 2007. Asymmetric T lymphocyte division in the initiation of adaptive immune responses. *Science*. 315:1687–1691. doi:10.1126/science.1139393.
- Chapman, T.J., and D.J. Topham. 2010. Identification of a unique population of tissue-memory CD4+ T cells in the airways after influenza infection that is dependent on the



- integrin VLA-1. *J. Immunol.* 184:3841–3849. doi:10.4049/jimmunol.0902281.
- Chen, L., and D.B. Flies. 2013. Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. *Nat Rev Immunol.* 13:227–242. doi:10.1038/nri3405.
- Cheung, K.P., E. Yang, and A.W. Goldrath. 2009. Memory-like CD8<sup>+</sup> T cells generated during homeostatic proliferation defer to antigen-experienced memory cells. *J. Immunol.* 183:3364–3372. doi:10.4049/jimmunol.0900641.
- Chiu, B.-C., B.E. Martin, V.R. Stolberg, and S.W. Chensue. 2013. Cutting edge: Central memory CD8 T cells in aged mice are virtual memory cells. *J. Immunol.* 191:5793–5796. doi:10.4049/jimmunol.1302509.
- Cho, B.K., V.P. Rao, Q. Ge, H.N. Eisen, and J. Chen. 2000. Homeostasis-stimulated proliferation drives naive T cells to differentiate directly into memory T cells. *Journal of Experimental Medicine.* 192:549–556.
- Cho, J.-H., H.-O. Kim, C.D. Surh, and J. Sprent. 2010. T cell receptor-dependent regulation of lipid rafts controls naive CD8<sup>+</sup> T cell homeostasis. *Immunity.* 32:214–226. doi:10.1016/j.immuni.2009.11.014.
- Cho, J.-H., H.-O. Kim, K.-S. Kim, D.-H. Yang, C.D. Surh, and J. Sprent. 2013. Unique features of naive CD8<sup>+</sup> T cell activation by IL-2. *J. Immunol.* 191:5559–5573. doi:10.4049/jimmunol.1302293.
- Chu, T., A.J. Tyznik, S. Roepke, A.M. Berkley, A. Woodward-Davis, L. Pattacini, M.J. Bevan, D. Zehn, and M. Prlic. 2013. Bystander-activated memory CD8 T cells control early pathogen load in an innate-like, NKG2D-dependent manner. *CellReports.* 3:701–708. doi:10.1016/j.celrep.2013.02.020.
- Crawford, A., J.M. Angelosanto, K.L. Nadwodny, S.D. Blackburn, and E.J. Wherry. 2011. A role for the chemokine RANTES in regulating CD8 T cell responses during chronic viral infection. *PLoS Pathog.* 7:e1002098. doi:10.1371/journal.ppat.1002098.
- Croft, M. 2009. The role of TNF superfamily members in T-cell function and diseases. *Nat Rev Immunol.* 9:271–285. doi:10.1038/nri2526.
- Crosby, E.J., M.H. Goldschmidt, E.J. Wherry, and P. Scott. 2014. Engagement of NKG2D on bystander memory CD8 T cells promotes increased immunopathology following *Leishmania major* infection. *PLoS Pathog.* 10:e1003970. doi:10.1371/journal.ppat.1003970.
- Crozat, K., R. Guiton, V. Contreras, V. Feuillet, C.-A. Dutertre, E. Ventre, T.-P. Vu Manh, T. Baranek, A.K. Storset, J. Marvel, P. Boudinot, A. Hosmalin, I. Schwartz-Cornil, and M. Dalod. 2010. The XC chemokine receptor 1 is a conserved selective marker of mammalian cells homologous to mouse CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> dendritic cells. *J. Exp. Med.* 207:1283–1292. doi:10.1084/jem.20100223.
- Cruz-Guilloty, F., M.E. Pipkin, I.M. Djuretic, D. Levanon, J. Lotem, M.G. Lichtenheld, Y. Groner, and A. Rao. 2009. Runx3 and T-box proteins cooperate to establish the transcriptional program of effector CTLs. *J. Exp. Med.* 206:51–59. doi:10.1084/jem.20081242.
- Cui, W., N.S. Joshi, A. Jiang, and S.M. Kaech. 2009. Effects of Signal 3 during CD8 T cell priming: Bystander production of IL-12 enhances effector T cell expansion but promotes



- terminal differentiation. *Vaccine*. 27:2177–2187. doi:10.1016/j.vaccine.2009.01.088.
- Curotto de Lafaille, M.A., and J.J. Lafaille. 2009. Natural and adaptive foxp3+ regulatory T cells: more of the same or a division of labor? *Immunity*. 30:626–635. doi:10.1016/j.immuni.2009.05.002.
- Curtsinger, J.M., and M.F. Mescher. 2010. Inflammatory cytokines as a third signal for T cell activation. *Current Opinion in Immunology*. 22:333–340. doi:10.1016/j.coi.2010.02.013.
- Curtsinger, J.M., C.S. Schmidt, A. Mondino, D.C. Lins, R.M. Kedl, M.K. Jenkins, and M.F. Mescher. 1999. Inflammatory cytokines provide a third signal for activation of naive CD4+ and CD8+ T cells. *The Journal of Immunology*. 162:3256–3262.
- Curtsinger, J.M., J.O. Valenzuela, P. Agarwal, D. Lins, and M.F. Mescher. 2005. Type I IFNs provide a third signal to CD8 T cells to stimulate clonal expansion and differentiation. *The Journal of Immunology*. 174:4465–4469. doi:10.4049/jimmunol.174.8.4465.
- Darmon, A.J. 2004. Activation of the apoptotic protease CPP32 by cytotoxic T-cell-derived granzyme B. *Nature*. 1–3.
- Day, C.L., D.E. Kaufmann, P. Kiepiela, J.A. Brown, E.S. Moodley, S. Reddy, E.W. Mackey, J.D. Miller, A.J. Leslie, C. DePierres, Z. Mncube, J. Duraiswamy, B. Zhu, Q. Eichbaum, M. Altfeld, E.J. Wherry, H.M. Coovadia, P.J.R. Goulder, P. Klenerman, R. Ahmed, G.J. Freeman, and B.D. Walker. 2006. PD-1 expression on HIV-specific T cells is associated with T-cell exhaustion and disease progression. *Nature*. 443:350–354. doi:10.1038/nature05115.
- de Saint Basile, G., G. Ménasché, and A. Fischer. 2010. Molecular mechanisms of biogenesis and exocytosis of cytotoxic granules. *Nat Rev Immunol*. 10:568–579. doi:10.1038/nri2803.
- Debes, G.F., C.N. Arnold, A.J. Young, S. Krautwald, M. Lipp, J.B. Hay, and E.C. Butcher. 2005. Chemokine receptor CCR7 required for T lymphocyte exit from peripheral tissues. *Nature Immunology*. 6:889–894. doi:10.1038/ni1238.
- Delon, J., K. Kaibuchi, and R.N. Germain. 2001. Exclusion of CD43 from the immunological synapse is mediated by phosphorylation-regulated relocation of the cytoskeletal adaptor moesin. *Immunity*. 15:691–701.
- Denton, A.E., B.E. Russ, P.C. Doherty, S. Rao, and S.J. Turner. 2011. Differentiation-dependent functional and epigenetic landscapes for cytokine genes in virus-specific CD8+ T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108:15306–15311. doi:10.1073/pnas.1112520108.
- Di Rosa, F., and R. Pabst. 2005. The bone marrow: a nest for migratory memory T cells. *Trends in Immunology*. 26:360–366. doi:10.1016/j.it.2005.04.011.
- Diefenbach, A., E. Tomasello, M. Lucas, A.M. Jamieson, J.K. Hsia, E. Vivier, and D.H. Raulet. 2002. Selective associations with signaling proteins determine stimulatory versus costimulatory activity of NKG2D. *Nature Immunology*. 3:1142–1149. doi:10.1038/ni858.
- Dolfi, D.V., A.C. Boesteanu, C. Petrovas, D. Xia, E.A. Butz, and P.D. Katsikis. 2008. Late signals from CD27 prevent Fas-dependent apoptosis of primary CD8+ T cells. *The Journal of Immunology*. 180:2912–2921. doi:10.4049/jimmunol.180.5.2912.

- Dong, H., N.A. Franklin, D.J. Roberts, H. Yagita, M.J. Glennie, and T.N.J. Bullock. 2012. CD27 stimulation promotes the frequency of IL-7 receptor-expressing memory precursors and prevents IL-12-mediated loss of CD8(+) T cell memory in the absence of CD4(+) T cell help. *J. Immunol.* 188:3829–3838. doi:10.4049/jimmunol.1103329.
- Dorner, B.G., A. Scheffold, M.S. Rolph, M.B. Huser, S.H.E. Kaufmann, A. Radbruch, I.E.A. Flesch, and R.A. Kroccek. 2002. MIP-1alpha, MIP-1beta, RANTES, and ATAC/lymphotactin function together with IFN-gamma as type 1 cytokines. *Proc Natl Acad Sci USA.* 99:6181–6186. doi:10.1073/pnas.092141999.
- Dorner, B.G., M.B. Dorner, X. Zhou, C. Opitz, A. Mora, S. GÜttler, A. Hutloff, H.W. Mages, K. Ranke, M. Schaefer, R.S. Jack, V. Henn, and R.A. Kroccek. 2009. Selective expression of the chemokine receptor XCR1 on cross-presenting dendritic cells determines cooperation with CD8+ T cells. *Immunity.* 31:823–833. doi:10.1016/j.immuni.2009.08.027.
- Dudda, J.C., A. Lembo, E. Bachtanian, J. Huehn, C. Siewert, A. Hamann, E. Kremmer, R. Förster, and S.F. Martin. 2005. Dendritic cells govern induction and reprogramming of polarized tissue-selective homing receptor patterns of T cells: important roles for soluble factors and tissue microenvironments. *Eur. J. Immunol.* 35:1056–1065. doi:10.1002/eji.200425817.
- D’Cruz, L.M., M.H. Stradner, C.Y. Yang, and A.W. Goldrath. 2014. E and Id proteins influence invariant NKT cell sublineage differentiation and proliferation. *J. Immunol.* 192:2227–2236. doi:10.4049/jimmunol.1302904.
- Eickhoff, S., A. Brewitz, M.Y. Gerner, F. Klauschen, K. Komander, H. Hemmi, N. Garbi, T. Kaisho, R.N. Germain, and W. Kastenmüller. 2015. Robust Anti-viral Immunity Requires Multiple Distinct T Cell-Dendritic Cell Interactions. *Cell.* 162:1322–1337. doi:10.1016/j.cell.2015.08.004.
- El-Asady, R., R. Yuan, K. Liu, D. Wang, R.E. Gress, P.J. Lucas, C.B. Drachenberg, and G.A. Hadley. 2005. TGF- $\beta$ -dependent CD103 expression by CD8(+) T cells promotes selective destruction of the host intestinal epithelium during graft-versus-host disease. *Journal of Experimental Medicine.* 201:1647–1657. doi:10.1084/jem.20041044.
- Elsaesser, H., K. Sauer, and D.G. Brooks. 2009. IL-21 is required to control chronic viral infection. *Science.* 324:1569–1572. doi:10.1126/science.1174182.
- Ernst, B. 1999. The Peptide Ligands Mediating Positive Selection in the Thymus Control T Cell Survival and Homeostatic Proliferation in the Periphery. *Immunity.* 1–9.
- Fang, M., S. Remakus, F. Roscoe, X. Ma, and L.J. Sigal. 2015. CD4+ T cell help is dispensable for protective CD8+ T cell memory against mousepox virus following vaccinia virus immunization. *Journal of Virology.* 89:776–783. doi:10.1128/JVI.02176-14.
- Fann, M., J.M. Godlove, M. Catalfamo, W.H. Wood, F.J. Chrest, N. Chun, L. Granger, R. Wersto, K. Madara, K. Becker, P.A. Henkart, and N.-P. Weng. 2006. Histone acetylation is associated with differential gene expression in the rapid and robust memory CD8(+) T-cell response. *Blood.* 108:3363–3370. doi:10.1182/blood-2006-02-005520.
- Feinerman, O., J. Veiga, J.R. Dorfman, R.N. Germain, and G. Altan-Bonnet. 2008. Variability and robustness in T cell activation from regulated heterogeneity in protein levels. *Science.* 321:1081–1084. doi:10.1126/science.1158013.

- Felices, M. 2009. Tec kinase Itk in T cells is pivotal for controlling IgE production in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1–10.
- Franciszkiewicz, K., M. Boutet, L. Gauthier, I. Vergnon, K. Peeters, O. Duc, B. Besse, G. de Saint Basile, S. Chouaib, and F. Mami-Chouaib. 2014. Synaptic release of CCL5 storage vesicles triggers CXCR4 surface expression promoting CTL migration in response to CXCL12. *J. Immunol.* 193:4952–4961. doi:10.4049/jimmunol.1401184.
- Fraser, J.H., M. Rincón, K.D. McCoy, and G. Le Gros. 1999. CTLA4 ligation attenuates AP-1, NFAT and NF-kappaB activity in activated T cells. *Eur. J. Immunol.* 29:838–844. doi:10.1002/(SICI)1521-4141(199903)29:03<838::AID-IMMU838>3.0.CO;2-P.
- Froelich, C.J., K. Orth, J. Turbov, P. Seth, R. Gottlieb, B. Babior, G.M. Shah, R.C. Bleackley, V.M. Dixit, and W. Hanna. 1996. New paradigm for lymphocyte granule-mediated cytotoxicity. Target cells bind and internalize granzyme B, but an endosomolytic agent is necessary for cytosolic delivery and subsequent apoptosis. *J. Biol. Chem.* 271:29073–29079.
- Fröhlich, A., J. Kisielow, I. Schmitz, S. Freigang, A.T. Shamshiev, J. Weber, B.J. Marsland, A. OXENIUS, and M. Kopf. 2009. IL-21R on T cells is critical for sustained functionality and control of chronic viral infection. *Science*. 324:1576–1580. doi:10.1126/science.1172815.
- Fuhlbrigge, R.C., J.D. Kieffer, D. Armerding, and T.S. Kupper. 1997. Cutaneous lymphocyte antigen is a specialized form of PSGL-1 expressed on skin-homing T cells. *Nature*. 389:978–981. doi:10.1038/40166.
- Fukuyama, T., L.H. Kasper, F. Boussouar, T. Jeevan, J. van Deursen, and P.K. Brindle. 2009. Histone acetyltransferase CBP is vital to demarcate conventional and innate CD8+ T-cell development. *Molecular and cellular biology*. 29:3894–3904. doi:10.1128/MCB.01598-08.
- Fulton, R.B., S.E. Hamilton, Y. Xing, J.A. Best, A.W. Goldrath, K.A. Hogquist, and S.C. Jameson. 2015. The TCR's sensitivity to self peptide-MHC dictates the ability of naive CD8(+) T cells to respond to foreign antigens. *Nature Publishing Group*. 16:107–117. doi:10.1038/ni.3043.
- Fuse, S., C.-Y. Tsai, M.J. Molloy, S.R. Allie, W. Zhang, H. Yagita, and E.J. Usherwood. 2009. Recall responses by helpless memory CD8+ T cells are restricted by the up-regulation of PD-1. *J. Immunol.* 182:4244–4254. doi:10.4049/jimmunol.0802041.
- Fuse, S., J.J. Obar, S. Bellfy, E.K. Leung, W. Zhang, and E.J. Usherwood. 2006. CD80 and CD86 control antiviral CD8+ T-cell function and immune surveillance of murine gammaherpesvirus 68. *Journal of Virology*. 80:9159–9170. doi:10.1128/JVI.00422-06.
- Garrod, K.R., H.D. Moreau, Z. Garcia, F. Lemaître, I. Bouvier, M.L. Albert, and P. Bousso. 2012. Dissecting T cell contraction in vivo using a genetically encoded reporter of apoptosis. *CellReports*. 2:1438–1447. doi:10.1016/j.celrep.2012.10.015.
- Gerlach, C., J.C. Rohr, L. Perié, N. van Rooij, J.W.J. van Heijst, A. Velds, J. Urbanus, S.H. Naik, H. Jacobs, J.B. Beltman, R.J. de Boer, and T.N.M. Schumacher. 2013. Heterogeneous differentiation patterns of individual CD8+ T cells. *Science*. 340:635–639. doi:10.1126/science.1235487.
- Gerlach, C., J.W.J. van Heijst, E. Swart, D. Sie, N. Armstrong, R.M. Kerkhoven, D. Zehn,

- M.J. Bevan, K. Schepers, and T.N.M. Schumacher. 2010. One naive T cell, multiple fates in CD8<sup>+</sup> T cell differentiation. *J. Exp. Med.* 207:1235–1246. doi:10.1084/jem.20091175.
- Goldrath, A.W., and M.J. Bevan. 1999. Low-affinity ligands for the TCR drive proliferation of mature CD8<sup>+</sup> T cells in lymphopenic hosts. *Immunity*. 11:183–190.
- Goldrath, A.W., C.J. Luckey, R. Park, C. Benoist, and D. Mathis. 2004. The molecular program induced in T cells undergoing homeostatic proliferation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 101:16885–16890. doi:10.1073/pnas.0407417101.
- Goldrath, A.W., L.Y. Bogatzki, and M.J. Bevan. 2000. Naive T cells transiently acquire a memory-like phenotype during homeostasis-driven proliferation. *Journal of Experimental Medicine*. 192:557–564.
- Goldrath, A.W., P.V. Sivakumar, M. Glaccum, M.K. Kennedy, M.J. Bevan, C. Benoist, D. Mathis, and E.A. Butz. 2002. Cytokine requirements for acute and Basal homeostatic proliferation of naive and memory CD8<sup>+</sup> T cells. *Journal of Experimental Medicine*. 195:1515–1522. doi:10.1084/jem.20020033.
- Gordon, S.M., S.A. Carty, J.S. Kim, T. Zou, J. Smith-Garvin, E.S. Alonzo, E. Haimm, D.B. Sant'Angelo, G.A. Koretzky, S.L. Reiner, and M.S. Jordan. 2011. Requirements for eomesodermin and promyelocytic leukemia zinc finger in the development of innate-like CD8<sup>+</sup> T cells. *J. Immunol.* 186:4573–4578. doi:10.4049/jimmunol.1100037.
- Grakoui, A., S.K. Bromley, C. Sumen, M.M. Davis, A.S. Shaw, P.M. Allen, and M.L. Dustin. 1999. The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. *Science*. 285:221–227.
- Green, D.R. 2008. Fas Bim boom! *Immunity*. 28:141–143. doi:10.1016/j.immuni.2008.01.004.
- Gugasyan, R., E. Horat, S.A. Kinkel, F. Ross, G. Grigoriadis, D. Gray, M. O'Keeffe, S.P. Berzins, G.T. Belz, R.J. Grumont, A. Banerjee, A. Strasser, D.I. Godfrey, P.N. Tsichlis, and S. Gerondakis. 2012. The NF- $\kappa$ B1 transcription factor prevents the intrathymic development of CD8 T cells with memory properties. *The EMBO journal*. 31:692–706. doi:10.1038/emboj.2011.435.
- Gumá, M., L.K. Busch, L.I. Salazar-Fontana, B. Bellosillo, C. Morte, P. García, and M. López-Botet. 2005. The CD94/NKG2C killer lectin-like receptor constitutes an alternative activation pathway for a subset of CD8<sup>+</sup> T cells. *Eur. J. Immunol.* 35:2071–2080. doi:10.1002/eji.200425843.
- Haan, den, J.M., S.M. Lehar, and M.J. Bevan. 2000. CD8(+) but not CD8(-) dendritic cells cross-prime cytotoxic T cells in vivo. *Journal of Experimental Medicine*. 192:1685–1696.
- Halstead, E.S., Y.M. Mueller, J.D. Altman, and P.D. Katsikis. 2002. In vivo stimulation of CD137 broadens primary antiviral CD8<sup>+</sup> T cell responses. *Nature Immunology*. 3:536–541. doi:10.1038/ni798.
- Haluszczak, C., A.D. Akue, S.E. Hamilton, L.D.S. Johnson, L. Pujanauski, L. Teodorovic, S.C. Jameson, and R.M. Kedl. 2009. The antigen-specific CD8<sup>+</sup> T cell repertoire in unimmunized mice includes memory phenotype cells bearing markers of homeostatic expansion. *J. Exp. Med.* 206:435–448. doi:10.1084/jem.20081829.
- Hamann, A., D.P. Andrew, D. Jablonski-Westrich, B. Holzmann, and E.C. Butcher. 1994.

- Role of alpha 4-integrins in lymphocyte homing to mucosal tissues in vivo. *The Journal of Immunology*. 152:3282–3293.
- Hamilton, S.E., M.C. Wolkers, S.P. Schoenberger, and S.C. Jameson. 2006. The generation of protective memory-like CD8+ T cells during homeostatic proliferation requires CD4+ T cells. *Nature Immunology*. 7:475–481. doi:10.1038/ni1326.
- Harhaj, E.W., S.B. Maggirwar, L. Good, and S.C. Sun. 1996. CD28 mediates a potent costimulatory signal for rapid degradation of IkappaBbeta which is associated with accelerated activation of various NF-kappaB/Rel heterodimers. *Molecular and cellular biology*. 16:6736–6743.
- Harty, J.T., and V.P. Badovinac. 2008. Shaping and reshaping CD8+ T-cell memory. *Nat Rev Immunol*. 8:107–119. doi:10.1038/nri2251.
- Hendriks, J., L.A. Gravestein, K. Tesselaar, R.A. van Lier, T.N. Schumacher, and J. Borst. 2000. CD27 is required for generation and long-term maintenance of T cell immunity. *Nature Immunology*. 1:433–440. doi:10.1038/80877.
- Hendriks, J., Y. Xiao, J.W.A. Rossen, K.F. van der Sluijs, K. Sugamura, N. Ishii, and J. Borst. 2005. During viral infection of the respiratory tract, CD27, 4-1BB, and OX40 collectively determine formation of CD8+ memory T cells and their capacity for secondary expansion. *The Journal of Immunology*. 175:1665–1676. doi:10.4049/jimmunol.175.3.1665.
- Henrickson, S.E., M. Perro, S.M. Loughhead, B. Senman, S. Stutte, M. Quigley, G. Alexe, M. Iannacone, M.P. Flynn, S. Omid, J.L. Jesneck, S. Imam, T.R. Mempel, I.B. Mazo, W.N. Haining, and U.H. von Andrian. 2013. Antigen Availability Determines CD8+ T Cell-Dendritic Cell Interaction Kinetics and Memory Fate Decisions. *Immunity*. 39:496–507. doi:10.1016/j.immuni.2013.08.034.
- Hickman, H.D., K. Takeda, C.N. Skon, F.R. Murray, S.E. Hensley, J. Loomis, G.N. Barber, J.R. Bennink, and J.W. Yewdell. 2008. Direct priming of antiviral CD8+ T cells in the peripheral interfollicular region of lymph nodes. *Nature Immunology*. 9:155–165. doi:10.1038/ni1557.
- Hikono, H., J.E. Kohlmeier, S. Takamura, S.T. Wittmer, A.D. Roberts, and D.L. Woodland. 2007. Activation phenotype, rather than central- or effector-memory phenotype, predicts the recall efficacy of memory CD8+ T cells. *Journal of Experimental Medicine*. 204:1625–1636. doi:10.1084/jem.20070322.
- Hildeman, D.A., Y. Zhu, T.C. Mitchell, P. Bouillet, A. Strasser, J. Kappler, and P. Marrack. 2002. Activated T cell death in vivo mediated by proapoptotic bcl-2 family member bim. *Immunity*. 16:759–767.
- Hirose, S., M. Touma, R. Go, Y. Katsuragi, Y. Sakuraba, Y. Gondo, M. Abe, K. Sakimura, Y. Mishima, and R. Kominami. 2015. Bcl11b prevents the intrathymic development of innate CD8 T cells in a cell intrinsic manner. *International Immunology*. 27:205–215. doi:10.1093/intimm/dxu104.
- Hogquist, K.A., S.C. Jameson, W.R. Heath, J.L. Howard, M.J. Bevan, and F.R. Carbone. 1994. T cell receptor antagonist peptides induce positive selection. *Cell*. 76:17–27.
- Hogquist, K.A., Y. Xing, F.-C. Hsu, and V.S. Shapiro. 2015. T Cell Adolescence: Maturation Events Beyond Positive Selection. *J. Immunol*. 195:1351–1357.



doi:10.4049/jimmunol.1501050.

- Homey, B., H. Alenius, A. Müller, H. Soto, E.P. Bowman, W. Yuan, L. McEvoy, A.I. Lauerma, T. Assmann, E. Bünemann, M. Lehto, H. Wolff, D. Yen, H. Marxhausen, W. To, J. Sedgwick, T. Ruzicka, P. Lehmann, and A. Zlotnik. 2002. CCL27-CCR10 interactions regulate T cell-mediated skin inflammation. *Nat Med.* 8:157–165. doi:10.1038/nm0202-157.
- Hor, J.L., P.G. Whitney, A. Zaid, A.G. Brooks, W.R. Heath, and S.N. Mueller. 2015. Spatiotemporally Distinct Interactions with Dendritic Cell Subsets Facilitates CD4(+) and CD8(+) T Cell Activation to Localized Viral Infection. *Immunity.* 43:554–565. doi:10.1016/j.immuni.2015.07.020.
- Hu, J., N. Sahu, E. Walsh, and A. August. 2007. Memory phenotype CD8+ T cells with innate function selectively develop in the absence of active Itk. *Eur. J. Immunol.* 37:2892–2899. doi:10.1002/eji.200737311.
- Hu, J.K., T. Kagari, J.M. Clingan, and M. Matloubian. 2011. Expression of chemokine receptor CXCR3 on T cells affects the balance between effector and memory CD8 T-cell generation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108:E118–27. doi:10.1073/pnas.1101881108.
- Hughes, P.D., G.T. Belz, K.A. Fortner, R.C. Budd, A. Strasser, and P. Bouillet. 2008. Apoptosis regulators Fas and Bim cooperate in shutdown of chronic immune responses and prevention of autoimmunity. *Immunity.* 28:197–205. doi:10.1016/j.immuni.2007.12.017.
- Hugues, S., A. Scholer, A. Boissonnas, A. Nussbaum, C. Combadière, S. Amigorena, and L. Fetler. 2007. Dynamic imaging of chemokine-dependent CD8+ T cell help for CD8+ T cell responses. *Nature Immunology.* 8:921–930. doi:10.1038/ni1495.
- Ichii, H., A. Sakamoto, M. Hatano, S. Okada, H. Toyama, S. Taki, M. Arima, Y. Kuroda, and T. Tokuhisa. 2002. Role for Bcl-6 in the generation and maintenance of memory CD8+ T cells. *Nature Immunology.* 3:558–563. doi:10.1038/ni802.
- Ichii, H., A. Sakamoto, Y. Kuroda, and T. Tokuhisa. 2004. Bcl6 acts as an amplifier for the generation and proliferative capacity of central memory CD8+ T cells. *The Journal of Immunology.* 173:883–891. doi:10.4049/jimmunol.173.2.883.
- Iezzi, G., K. Karjalainen, and A. Lanzavecchia. 1998. The duration of antigenic stimulation determines the fate of naive and effector T cells. *Immunity.* 8:89–95.
- Iijima, N., and A. Iwasaki. 2015. Tissue instruction for migration and retention of TRM cells. *Trends in Immunology.* 36:556–564. doi:10.1016/j.it.2015.07.002.
- Intlekofer, A.M., N. Takemoto, E.J. Wherry, S.A. Longworth, J.T. Northrup, V.R. Palanivel, A.C. Mullen, C.R. Gasink, S.M. Kaech, J.D. Miller, L. Gapin, K. Ryan, A.P. Russ, T. Lindsten, J.S. Orange, A.W. Goldrath, R. Ahmed, and S.L. Reiner. 2005. Effector and memory CD8+ T cell fate coupled by T-bet and eomesodermin. *Nature Immunology.* 6:1236–1244. doi:10.1038/ni1268.
- Iwai, Y., S. Terawaki, M. Ikegawa, T. Okazaki, and T. Honjo. 2003. PD-1 inhibits antiviral immunity at the effector phase in the liver. *Journal of Experimental Medicine.* 198:39–50. doi:10.1084/jem.20022235.
- Jacomet, F., E. Cayssials, S. Basbous, A. Levescot, N. Piccirilli, D. Desmier, A. Robin, A.



- Barra, C. Giraud, F. Guilhot, L. Roy, A. Herbelin, and J.-M. Gombert. 2015a. Evidence for eomesodermin-expressing innate-like CD8 +kir/nkg2a +t cells in human adults and cord blood samples. *Eur. J. Immunol.* n/a–n/a. doi:10.1002/eji.201545539.
- Jacomet, F., E. Cayssials, S. Basbous, A. Levescot, N. Piccirilli, D. Desmier, A. Robin, A. Barra, C. Giraud, F. Guilhot, L. Roy, A. Herbelin, and J.-M. Gombert. 2015b. Evidence for eomesodermin-expressing innate-like CD8(+) KIR/NKG2A(+) T cells in human adults and cord blood samples. *Eur. J. Immunol.* 45:1926–1933. doi:10.1002/eji.201545539.
- Jameson, S.C., and D. Masopust. 2009. Diversity in T cell memory: an embarrassment of riches. *Immunity.* 31:859–871. doi:10.1016/j.immuni.2009.11.007.
- Jameson, S.C., Y.J. Lee, and K.A. Hogquist. 2015. Innate memory T cells. *Adv. Immunol.* 126:173–213. doi:10.1016/bs.ai.2014.12.001.
- Janssen, E.M., E.E. Lemmens, T. Wolfe, U. Christen, M.G. von Herrath, and S.P. Schoenberger. 2003. CD4+ T cells are required for secondary expansion and memory in CD8+ T lymphocytes. *Nature.* 421:852–856. doi:10.1038/nature01441.
- Jennrich, S., M.H. Lee, R.C. Lynn, K. Dewberry, and G.F. Debes. 2012. Tissue exit: a novel control point in the accumulation of antigen-specific CD8 T cells in the influenza a virus-infected lung. *Journal of Virology.* 86:3436–3445. doi:10.1128/JVI.07025-11.
- Ji, Y., Z. Pos, M. Rao, C.A. Klebanoff, Z. Yu, M. Sukumar, R.N. Reger, D.C. Palmer, Z.A. Borman, P. Muranski, E. Wang, D.S. Schrumpp, F.M. Marincola, N.P. Restifo, and L. Gattinoni. 2011. Repression of the DNA-binding inhibitor Id3 by Blimp-1 limits the formation of memory CD8+ T cells. *Nature Publishing Group.* 12:1230–1237. doi:10.1038/ni.2153.
- Jiang, J.Q., X.-S. He, N. Feng, and H.B. Greenberg. 2008. Qualitative and quantitative characteristics of rotavirus-specific CD8 T cells vary depending on the route of infection. *Journal of Virology.* 82:6812–6819. doi:10.1128/JVI.00450-08.
- Jiang, X., R.A. Clark, L. Liu, A.J. Wagers, R.C. Fuhlbrigge, and T.S. Kupper. 2012. Skin infection generates non-migratory memory CD8+ T(RM) cells providing global skin immunity. *Nature.* 483:227–231. doi:10.1038/nature10851.
- Joffre, O.P., E. Segura, A. Savina, and S. Amigorena. 2012. Cross-presentation by dendritic cells. *Nat Rev Immunol.* 12:557–569. doi:10.1038/nri3254.
- Jordan, M.S., J.E. Smith, J.C. Burns, J.-E.T. Austin, K.E. Nichols, A.C. Aschenbrenner, and G.A. Koretzky. 2008. Complementmentation In Trans of Altered Thymocyte Development in Mice Expressing Mutant Forms of the Adaptor Molecule SLP76. *Immunity.* 28:359–369. doi:10.1016/j.immuni.2008.01.010.
- Joshi, N.S., W. Cui, A. Chandele, H.K. Lee, D.R. Urso, J. Hagman, L. Gapin, and S.M. Kaeck. 2007. Inflammation directs memory precursor and short-lived effector CD8(+) T cell fates via the graded expression of T-bet transcription factor. *Immunity.* 27:281–295. doi:10.1016/j.immuni.2007.07.010.
- Jung, S., D. Unutmaz, P. Wong, G.-I. Sano, K. De los Santos, T. Sparwasser, S. Wu, S. Vuthoori, K. Ko, F. Zavala, E.G. Pamer, D.R. Littman, and R.A. Lang. 2002. In vivo depletion of CD11c+ dendritic cells abrogates priming of CD8+ T cells by exogenous cell-associated antigens. *Immunity.* 17:211–220.

- Kaech, S.M., and R. Ahmed. 2001. Memory CD8<sup>+</sup> T cell differentiation: initial antigen encounter triggers a developmental program in naïve cells. *Nature Immunology*. 2:415–422. doi:10.1038/87720.
- Kaech, S.M., and W. Cui. 2012. Transcriptional control of effector and memory CD8<sup>+</sup> T cell differentiation. *Nature Publishing Group*. 12:749–761. doi:10.1038/nri3307.
- Kaech, S.M., J.T. Tan, E.J. Wherry, B.T. Konieczny, C.D. Surh, and R. Ahmed. 2003. Selective expression of the interleukin 7 receptor identifies effector CD8 T cells that give rise to long-lived memory cells. *Nature Immunology*. 4:1191–1198. doi:10.1038/ni1009.
- Kalia, V., S. Sarkar, S. Subramaniam, W.N. Haining, K.A. Smith, and R. Ahmed. 2010. Prolonged interleukin-2R $\alpha$  expression on virus-specific CD8<sup>+</sup> T cells favors terminal-effector differentiation in vivo. *Immunity*. 32:91–103. doi:10.1016/j.immuni.2009.11.010.
- Kallies, A., A. Xin, G.T. Belz, and S.L. Nutt. 2009. Blimp-1 transcription factor is required for the differentiation of effector CD8(+) T cells and memory responses. *Immunity*. 31:283–295. doi:10.1016/j.immuni.2009.06.021.
- Kambayashi, T., E. Assarsson, A.E. Lukacher, H.-G. Ljunggren, and P.E. Jensen. 2003. Memory CD8<sup>+</sup> T cells provide an early source of IFN- $\gamma$ . *The Journal of Immunology*. 170:2399–2408. doi:10.4049/jimmunol.170.5.2399.
- Kamimura, D., and M.J. Bevan. 2007. Naive CD8<sup>+</sup> T cells differentiate into protective memory-like cells after IL-2 anti IL-2 complex treatment in vivo. *Journal of Experimental Medicine*. 204:1803–1812. doi:10.1084/jem.20070543.
- Kappler, J.W., N. Roehm, and P. Marrack. 1987. T cell tolerance by clonal elimination in the thymus. *Cell*. 49:273–280.
- Kastenmüller, W., M. Brandes, Z. Wang, J. Herz, J.G. Egen, and R.N. Germain. 2013. Peripheral prepositioning and local CXCL9 chemokine-mediated guidance orchestrate rapid memory CD8<sup>+</sup> T cell responses in the lymph node. *Immunity*. 38:502–513. doi:10.1016/j.immuni.2012.11.012.
- Kägi, D., F. Vignaux, B. Ledermann, K. Bürki, V. Depraetere, S. Nagata, H. Hengartner, and P. Golstein. 1994. Fas and perforin pathways as major mechanisms of T cell-mediated cytotoxicity. *Science*. 265:528–530.
- Keefe, D., L. Shi, S. Feske, R. Massol, F. Navarro, T. Kirchhausen, and J. Lieberman. 2005. Perforin triggers a plasma membrane-repair response that facilitates CTL induction of apoptosis. *Immunity*. 23:249–262. doi:10.1016/j.immuni.2005.08.001.
- Keir, M.E., M.J. Butte, G.J. Freeman, and A.H. Sharpe. 2008. PD-1 and Its Ligands in Tolerance and Immunity. *Annu. Rev. Immunol.* 26:677–704. doi:10.1146/annurev.immunol.26.021607.090331.
- Keppler, S.J., K. Theil, S. Vucikuj, and P. Aichele. 2009. Effector T-cell differentiation during viral and bacterial infections: Role of direct IL-12 signals for cell fate decision of CD8(+) T cells. *Eur. J. Immunol.* 39:1774–1783. doi:10.1002/eji.200839093.
- Kersh, E.N., D.R. Fitzpatrick, K. Murali-Krishna, J. Shires, S.H. Speck, J.M. Boss, and R. Ahmed. 2006. Rapid demethylation of the IFN- $\gamma$  gene occurs in memory but not naive CD8 T cells. *The Journal of Immunology*. 176:4083–4093.

doi:10.4049/jimmunol.176.7.4083.

- Kieper, W.C., and S.C. Jameson. 1999. Homeostatic expansion and phenotypic conversion of naïve T cells in response to self peptide/MHC ligands. *Proc Natl Acad Sci USA*. 96:13306–13311.
- Kieper, W.C., J.T. Burghardt, and C.D. Surh. 2004. A role for TCR affinity in regulating naïve T cell homeostasis. *The Journal of Immunology*. 172:40–44. doi:10.4049/jimmunol.172.1.40.
- Kieper, W.C., M. PRLIC, C.S. Schmidt, M.F. Mescher, and S.C. Jameson. 2001. IL-12 Enhances CD8 T Cell Homeostatic Expansion. *The Journal of Immunology*. 166:5515–5521. doi:10.4049/jimmunol.166.9.5515.
- Kim, D.S., W. Zhang, S.E. Millman, B.J. Hwang, S.J. Kwon, C. Clayberger, M. Pagano, and A.M. Krensky. 2012. Fbw7 $\gamma$ -mediated degradation of KLF13 prevents RANTES expression in resting human but not murine T lymphocytes. *Blood*. 120:1658–1667. doi:10.1182/blood-2012-03-415968.
- Kim, H.-J., X. Wang, S. Radfar, T.J. Sproule, D.C. Roopenian, and H. Cantor. 2011. CD8+ T regulatory cells express the Ly49 Class I MHC receptor and are defective in autoimmune prone B6-Yaa mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108:2010–2015. doi:10.1073/pnas.1018974108.
- King, C., A. Ilic, K. Koelsch, and N. Sarvetnick. 2004. Homeostatic expansion of T cells during immune insufficiency generates autoimmunity. *Cell*. 117:265–277. doi:10.1038/nri1377.
- Kirberg, J., A. Berns, and H. von Boehmer. 1997. Peripheral T cell survival requires continual ligation of the T cell receptor to major histocompatibility complex-encoded molecules. *Journal of Experimental Medicine*. 186:1269–1275.
- Kisielow, P., H. Blüthmann, U.D. Staerz, M. Steinmetz, and H. von Boehmer. 1988. Tolerance in T-cell-receptor transgenic mice involves deletion of nonmature CD4+8+ thymocytes. *Nature*. 333:742–746. doi:10.1038/333742a0.
- Klein, L., B. Kyewski, P.M. Allen, and K.A. Hogquist. 2014. Positive and negative selection of the T cell repertoire: what thymocytes see (and don't see). *Nat Rev Immunol*. 14:377–391. doi:10.1038/nri3667.
- Knudson, K.M., S.E. Hamilton, M.A. Daniels, S.C. Jameson, and E. Teixeiro. 2013. Cutting edge: The signals for the generation of T cell memory are qualitatively different depending on TCR ligand strength. *J. Immunol*. 191:5797–5801. doi:10.4049/jimmunol.1300905.
- Koble, C., and B. Kyewski. 2009. The thymic medulla: a unique microenvironment for intercellular self-antigen transfer. *J. Exp. Med*. 206:1505–1513. doi:10.1084/jem.20082449.
- Kohlmeier, J.E., S.C. Miller, J. Smith, B. Lu, C. Gerard, T. Cookenham, A.D. Roberts, and D.L. Woodland. 2008. The chemokine receptor CCR5 plays a key role in the early memory CD8+ T cell response to respiratory virus infections. *Immunity*. 29:101–113. doi:10.1016/j.immuni.2008.05.011.
- Kohlmeier, J.E., W.W. Reiley, G. Perona-Wright, M.L. Freeman, E.J. Yager, L.M. Connor,

- E.L. Brincks, T. Cookenham, A.D. Roberts, C.E. Burkum, S. Sell, G.M. Winslow, M.A. Blackman, M. Mohrs, and D.L. Woodland. 2011. Inflammatory chemokine receptors regulate CD8(+) T cell contraction and memory generation following infection. *J. Exp. Med.* 208:1621–1634. doi:10.1084/jem.20102110.
- Kolumam, G.A., S. Thomas, L.J. Thompson, J. Sprent, and K. Murali-Krishna. 2005. Type I interferons act directly on CD8 T cells to allow clonal expansion and memory formation in response to viral infection. *Journal of Experimental Medicine*. 202:637–650. doi:10.1084/jem.20050821.
- Krummel, M.F., and J.P. Allison. 1995. CD28 and CTLA-4 have opposing effects on the response of T cells to stimulation. *Journal of Experimental Medicine*. 182:459–465.
- Kurachi, M., J. Kurachi, F. Suenaga, T. Tsukui, J. Abe, S. Ueha, M. Tomura, K. Sugihara, S. Takamura, K. Kakimi, and K. Matsushima. 2011. Chemokine receptor CXCR3 facilitates CD8(+) T cell differentiation into short-lived effector cells leading to memory degeneration. *J. Exp. Med.* 208:1605–1620. doi:10.1084/jem.20102101.
- Kurzweil, V., A. LaRoche, and P.M. Oliver. 2014. Increased Peripheral IL-4 Leads to an Expanded Virtual Memory CD8+ Population. *The Journal of Immunology*. 192:5643–5651. doi:10.4049/jimmunol.1301755.
- Lai, D., J. Zhu, T. Wang, J. Hu-Li, M. Terabe, J.A. Berzofsky, C. Clayberger, and A.M. Krensky. 2011. KLF13 sustains thymic memory-like CD8(+) T cells in BALB/c mice by regulating IL-4-generating invariant natural killer T cells. *J. Exp. Med.* 208:1093–1103. doi:10.1084/jem.20101527.
- Laidlaw, B.J., N. Zhang, H.D. Marshall, M.M. Staron, T. Guan, Y. Hu, L.S. Cauley, J. Craft, and S.M. Kaech. 2014. CD4+ T cell help guides formation of CD103+ lung-resident memory CD8+ T cells during influenza viral infection. *Immunity*. 41:633–645. doi:10.1016/j.immuni.2014.09.007.
- Lanier, L.L. 2015. NKG2D Receptor and Its Ligands in Host Defense. *Cancer Immunol Res.* 3:575–582. doi:10.1158/2326-6066.CIR-15-0098.
- Lau, L.L., B.D. Jamieson, T. Somasundaram, and R. Ahmed. 1994. Cytotoxic T-cell memory without antigen. *Nature*. 369:648–652. doi:10.1038/369648a0.
- Lauritsen, J.P.H., G.W. Wong, S.-Y. Lee, J.M. Lefebvre, M. Ciofani, M. Rhodes, D.J. Kappes, J.C. ZUNiga-PflUcker, and D.L. Wiest. 2009. Marked Induction of the Helix-Loop-Helix Protein Id3 Promotes the  $\gamma$ ;  $\delta$  T Cell Fate and Renders Their Functional Maturation Notch Independent. *Immunity*. 31:565–575. doi:10.1016/j.immuni.2009.07.010.
- Law, R.H.P., N. Lukyanova, I. Voskoboinik, T.T. Caradoc-Davies, K. Baran, M.A. Dunstone, M.E. D'Angelo, E.V. Orlova, F. Coulibaly, S. Verschoor, K.A. Browne, A. Ciccone, M.J. Kuiper, P.I. Bird, J.A. Trapani, H.R. Saibil, and J.C. Whisstock. 2010. The structural basis for membrane binding and pore formation by lymphocyte perforin. *Nature*. 468:447–451. doi:10.1038/nature09518.
- Lämmermann, T., and M. Sixt. 2008. The microanatomy of T-cell responses. *Immunological reviews*. 221:26–43. doi:10.1111/j.1600-065X.2008.00592.x.
- Le Bon, A., V. Durand, E. Kamphuis, C. Thompson, S. Bulfone-Paus, C. Rossmann, U. Kalinke, and D.F. Tough. 2006. Direct stimulation of T cells by type I IFN enhances the

- CD8<sup>+</sup> T cell response during cross-priming. *The Journal of Immunology*. 176:4682–4689. doi:10.4049/jimmunol.176.8.4682.
- Le Campion, A., C. Bourgeois, F. Lambolez, B. Martin, S. Léaument, N. Dautigny, C. Tanchot, C. Pénit, and B. Lucas. 2002. Naive T cells proliferate strongly in neonatal mice in response to self-peptide/self-MHC complexes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 99:4538–4543. doi:10.1073/pnas.062621699.
- Lee, A., S.P. Park, C.H. Park, B.H. Kang, S.H. Park, S.-J. Ha, and K.C. Jung. 2015. IL-4 Induced Innate CD8<sup>+</sup> T Cells Control Persistent Viral Infection. *PLoS Pathog*. 11:e1005193. doi:10.1371/journal.ppat.1005193.
- Lee, J.-Y., S.E. Hamilton, A.D. Akue, K.A. Hogquist, and S.C. Jameson. 2013a. Virtual memory CD8 T cells display unique functional properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110:13498–13503. doi:10.1073/pnas.1307572110.
- Lee, L.N., E.O. Ronan, C. de Lara, K.L.M.C. Franken, T.H.M. Ottenhoff, E.Z. Tchilian, and P.C.L. Beverley. 2011a. CXCR6 is a marker for protective antigen-specific cells in the lungs after intranasal immunization against *Mycobacterium tuberculosis*. *Infection and immunity*. 79:3328–3337. doi:10.1128/IAI.01133-10.
- Lee, Y.-T., J.E. Suarez-Ramirez, T. Wu, J.M. Redman, K. Bouchard, G.A. Hadley, and L.S. Cauley. 2011b. Environmental and antigen receptor-derived signals support sustained surveillance of the lungs by pathogen-specific cytotoxic T lymphocytes. *Journal of Virology*. 85:4085–4094. doi:10.1128/JVI.02493-10.
- Lee, Y.J., K.L. Holzapfel, J. Zhu, S.C. Jameson, and K.A. Hogquist. 2013b. Steady-state production of IL-4 modulates immunity in mouse strains and is determined by lineage diversity of iNKT cells. *Nature Immunology*. 14:1146–1154. doi:10.1038/ni.2731.
- Lee, Y.J., S.C. Jameson, and K.A. Hogquist. 2011c. Alternative memory in the CD8 T cell lineage. *Trends in Immunology*. 32:50–56. doi:10.1016/j.it.2010.12.004.
- Lefrançois, L., C.M. Parker, S. Olson, W. Müller, N. Wagner, M.P. Schön, and L. Puddington. 1999. The role of beta7 integrins in CD8 T cell trafficking during an antiviral immune response. *Journal of Experimental Medicine*. 189:1631–1638.
- Lemaître, F., H.D. Moreau, L. Vedele, and P. Bousso. 2013. Phenotypic CD8<sup>+</sup> T cell diversification occurs before, during, and after the first T cell division. *J. Immunol*. 191:1578–1585. doi:10.4049/jimmunol.1300424.
- Lertmemongkolkhai, G., G. Cai, C.A. Hunter, and G.J. Bancroft. 2001. Bystander activation of CD8<sup>+</sup> T cells contributes to the rapid production of IFN- $\gamma$  in response to bacterial pathogens. *The Journal of Immunology*. 166:1097–1105. doi:10.4049/jimmunol.166.2.1097.
- Ley, K., C. Laudanna, M.I. Cybulsky, and S. Nourshargh. 2007. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol*. 7:678–689. doi:10.1038/nri2156.
- Li, J.H., D. Rosen, D. Ronen, C.K. Behrens, P.H. Krammer, W.R. Clark, and G. Berke. 1998. The regulation of CD95 ligand expression and function in CTL. *The Journal of Immunology*. 161:3943–3949.
- Li, Q., R.R. Rao, K. Araki, K. Pollizzi, K. Odunsi, J.D. Powell, and P.A. Shrikant. 2011. A



- central role for mTOR kinase in homeostatic proliferation induced CD8<sup>+</sup> T cell memory and tumor immunity. *Immunity*. 34:541–553. doi:10.1016/j.immuni.2011.04.006.
- Lim, K., Y.-M. Hyun, K. Lambert-Emo, T. Capece, S. Bae, R. Miller, D.J. Topham, and M. Kim. 2015. Neutrophil trails guide influenza-specific CD8<sup>+</sup> T cells in the airways. *Science*. 349:aaa4352–aaa4352. doi:10.1126/science.aaa4352.
- Lim, P.S., J. Li, A.F. Holloway, and S. Rao. 2013. Epigenetic regulation of inducible gene expression in the immune system. *Immunology*. 139:285–293. doi:10.1111/imm.12100.
- Lindquist, R.L., G. Shakhar, D. Dudziak, H. Wardemann, T. Eisenreich, M.L. Dustin, and M.C. Nussenzweig. 2004. Visualizing dendritic cell networks in vivo. *Nature Immunology*. 5:1243–1250. doi:10.1038/ni1139.
- Lindstein, T., C.H. June, J.A. Ledbetter, G. Stella, and C.B. Thompson. 1989. Regulation of lymphokine messenger RNA stability by a surface-mediated T cell activation pathway. *Science*. 244:339–343.
- Liu, J., D. Chen, G.D. Nie, and Z. Dai. 2015. CD8(+)CD122(+) T-Cells: A Newly Emerging Regulator with Central Memory Cell Phenotypes. *Front. Immunol.* 6:494. doi:10.3389/fimmu.2015.00494.
- Lopez, J.A., O. Susanto, M.R. Jenkins, N. Lukoyanova, V.R. Sutton, R.H.P. Law, A. Johnston, C.H. Bird, P.I. Bird, J.C. Whisstock, J.A. Trapani, H.R. Saibil, and I. Voskoboinik. 2013. Perforin forms transient pores on the target cell plasma membrane to facilitate rapid access of granzymes during killer cell attack. *Blood*. 121:2659–2668. doi:10.1182/blood-2012-07-446146.
- Lu, Q., A. Wu, D. Ray, C. Deng, J. Attwood, S. Hanash, M. Pipkin, M. Lichtenheld, and B. Richardson. 2003. DNA methylation and chromatin structure regulate T cell perforin gene expression. *The Journal of Immunology*. 170:5124–5132. doi:10.4049/jimmunol.170.10.5124.
- Mackay, L.K., A. Rahimpour, J.Z. Ma, N. Collins, A.T. Stock, M.-L. Hafon, J. Vega-Ramos, P. Lauzurica, S.N. Mueller, T. Stefanovic, D.C. Tschärke, W.R. Heath, M. Inouye, F.R. Carbone, and T. Gebhardt. 2013. The developmental pathway for CD103<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> tissue-resident memory T cells of skin. *Nature Publishing Group*. 14:1294–1301. doi:10.1038/ni.2744.
- Mamalaki, C., J. Elliott, T. Norton, N. Yannoutsos, A.R. Townsend, P. Chandler, E. Simpson, and D. Kioussis. 1993. Positive and negative selection in transgenic mice expressing a T-cell receptor specific for influenza nucleoprotein and endogenous superantigen. *Dev. Immunol.* 3:159–174.
- Manders, P.M., P.J. Hunter, A.I. Telaranta, J.M. Carr, J.L. Marshall, M. Carrasco, Y. Murakami, M.J. Palmowski, V. Cerundolo, S.M. Kaech, R. Ahmed, and D.T. Fearon. 2005. BCL6b mediates the enhanced magnitude of the secondary response of memory CD8<sup>+</sup> T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 102:7418–7425. doi:10.1073/pnas.0501585102.
- Marçais, A., C.-A. Coupet, T. Walzer, M. Tomkowiak, R. Ghittoni, and J. Marvel. 2006a. Cell-autonomous CCL5 transcription by memory CD8 T cells is regulated by IL-4. *The Journal of Immunology*. 177:4451–4457.
- Marçais, A., M. Tomkowiak, T. Walzer, C.-A. Coupet, A. Ravel-Chapuis, and J. Marvel.



- 2006b. Maintenance of CCL5 mRNA stores by post-effector and memory CD8 T cells is dependent on transcription and is coupled to increased mRNA stability. *Eur. J. Immunol.* 36:2745–2754. doi:10.1002/eji.200636259.
- Martinet, V., S. Tonon, D. Torres, A. Azouz, M. Nguyen, A. Kohler, V. Flamand, C.-A. Mao, W.H. Klein, O. Leo, and S. Goriely. 2015. Type I interferons regulate eomesodermin expression and the development of unconventional memory CD8(+) T cells. *Nature Communications*. 6:7089. doi:10.1038/ncomms8089.
- Marzo, A.L., K.D. Klonowski, A. Le Bon, P. Borrow, D.F. Tough, and L. Lefrançois. 2005. Initial T cell frequency dictates memory CD8+ T cell lineage commitment. *Nature Immunology*. 6:793–799. doi:10.1038/ni1227.
- Masopust, D., V. Vezys, A.L. Marzo, and L. Lefrançois. 2001. Preferential localization of effector memory cells in nonlymphoid tissue. *Science*. 291:2413–2417. doi:10.1126/science.1058867.
- Masson, F., T. Calzascia, W. Di Berardino-Besson, N. de Tribolet, P.-Y. Dietrich, and P.R. Walker. 2007. Brain microenvironment promotes the final functional maturation of tumor-specific effector CD8+ T cells. *The Journal of Immunology*. 179:845–853. doi:10.4049/jimmunol.179.2.845.
- Matter, M., B. Odermatt, H. Yagita, J.-M. Nuoffer, and A.F. Ochsenbein. 2006. Elimination of chronic viral infection by blocking CD27 signaling. *Journal of Experimental Medicine*. 203:2145–2155. doi:10.1084/jem.20060651.
- Mazo, I.B., M. Honczarenko, H. Leung, L.L. Cavanagh, R. Bonasio, W. Weninger, K. Engelke, L. Xia, R.P. McEver, P.A. Koni, L.E. Silberstein, and U.H. von Andrian. 2005. Bone marrow is a major reservoir and site of recruitment for central memory CD8+ T cells. *Immunity*. 22:259–270. doi:10.1016/j.immuni.2005.01.008.
- Mazzucchelli, R., and S.K. Durum. 2007. Interleukin-7 receptor expression: intelligent design. *Nat Rev Immunol*. 7:144–154. doi:10.1038/nri2023.
- McAdam, A.J., E.A. Farkash, B.E. Gewurz, and A.H. Sharpe. 2000. B7 costimulation is critical for antibody class switching and CD8(+) cytotoxic T-lymphocyte generation in the host response to vesicular stomatitis virus. *Journal of Virology*. 74:203–208.
- McMahon, C.W., A.J. Zajac, A.M. Jamieson, L. Corral, G.E. Hammer, R. Ahmed, and D.H. Raulet. 2002. Viral and bacterial infections induce expression of multiple NK cell receptors in responding CD8(+) T cells. *The Journal of Immunology*. 169:1444–1452. doi:10.4049/jimmunol.169.3.1444.
- McMaster, S.R., J.J. Wilson, H. Wang, and J.E. Kohlmeier. 2015. Airway-Resident Memory CD8 T Cells Provide Antigen-Specific Protection against Respiratory Virus Challenge through Rapid IFN- $\gamma$  Production. *J. Immunol.* 195:203–209. doi:10.4049/jimmunol.1402975.
- McNally, B., M. Willette, F. Ye, S. Partida-Sanchez, and E. Flaño. 2012. Intranasal administration of dsRNA analog poly(I:C) induces interferon- $\alpha$  receptor-dependent accumulation of antigen experienced T cells in the airways. *PLoS ONE*. 7:e51351. doi:10.1371/journal.pone.0051351.
- Mempel, T.R., S.E. Henrickson, and U.H. von Andrian. 2004. T-cell priming by dendritic cells in lymph nodes occurs in three distinct phases. *Nature*. 427:154–159.

doi:10.1038/nature02238.

- Mempel, T.R., T. Junt, and U.H. von Andrian. 2006. Rulers over randomness: stroma cells guide lymphocyte migration in lymph nodes. *Immunity*. 25:867–869. doi:10.1016/j.immuni.2006.11.002.
- Michalek, R.D., and J.C. Rathmell. 2010. The metabolic life and times of a T-cell. *Immunological reviews*. 236:190–202. doi:10.1111/j.1600-065X.2010.00911.x.
- Michel, F., G. Mangino, G. Attal-Bonnefoy, L. Tuosto, A. Alcover, A. Roumier, D. Olive, and O. Acuto. 2000. CD28 utilizes Vav-1 to enhance TCR-proximal signaling and NF-AT activation. *The Journal of Immunology*. 165:3820–3829. doi:10.4049/jimmunol.165.7.3820.
- Middleton, J., A.M. Patterson, L. Gardner, C. Schmutz, and B.A. Ashton. 2002. Leukocyte extravasation: chemokine transport and presentation by the endothelium. *Blood*. 100:3853–3860. doi:10.1182/blood.V100.12.3853.
- Miller, M.J., A.S. Hejazi, S.H. Wei, M.D. Cahalan, and I. Parker. 2004. T cell repertoire scanning is promoted by dynamic dendritic cell behavior and random T cell motility in the lymph node. *Proc Natl Acad Sci USA*. 101:998–1003. doi:10.1073/pnas.0306407101.
- Millet, V., P. Naquet, and R.R. Guinamard. 2008. Intercellular MHC transfer between thymic epithelial and dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* 38:1257–1263. doi:10.1002/eji.200737982.
- Min, H.S., Y.J. Lee, Y.K. Jeon, E.J. Kim, B.H. Kang, K.C. Jung, C.H. Chang, and S.H. Park. 2011. MHC Class II-Restricted Interaction between Thymocytes Plays an Essential Role in the Production of Innate CD8<sup>+</sup> T Cells. *The Journal of Immunology*. 186:5749–5757. doi:10.4049/jimmunol.1002825.
- Mittrücker, H.-W., A. Visekruna, and M. Huber. 2014. Heterogeneity in the differentiation and function of CD8<sup>+</sup> T cells. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* 62:449–458. doi:10.1007/s00005-014-0293-y.
- Monks, C.R., B.A. Freiberg, H. Kupfer, N. Sciaky, and A. Kupfer. 1998. Three-dimensional segregation of supramolecular activation clusters in T cells. *Nature*. 395:82–86. doi:10.1038/25764.
- Montufar-Solis, D., T. Garza, and J.R. Klein. 2005. Selective upregulation of immune regulatory and effector cytokine synthesis by intestinal intraepithelial lymphocytes following CD43 costimulation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 338:1158–1163. doi:10.1016/j.bbrc.2005.10.050.
- Mora, J.R., G. Cheng, D. Picarella, M. Briskin, N. Buchanan, and U.H. von Andrian. 2005. Reciprocal and dynamic control of CD8 T cell homing by dendritic cells from skin- and gut-associated lymphoid tissues. *Journal of Experimental Medicine*. 201:303–316. doi:10.1084/jem.20041645.
- Mora, J.R., M.R. Bono, N. Manjunath, W. Weninger, L.L. Cavanagh, M. Roseblatt, and U.H. von Andrian. 2003. Selective imprinting of gut-homing T cells by Peyer's patch dendritic cells. *Nature*. 424:88–93. doi:10.1038/nature01726.
- Moriuchi, H., M. Moriuchi, and A.S. Fauci. 1997. Nuclear factor-kappa B potentially up-regulates the promoter activity of RANTES, a chemokine that blocks HIV infection. *The*

- Morris, S.C., S.M. Heidorn, D.R. Herbert, C. Perkins, D.A. Hildeman, M.V. Khodoun, and F.D. Finkelman. 2009. Endogenously produced IL-4 nonredundantly stimulates CD8<sup>+</sup> T cell proliferation. *J. Immunol.* 182:1429–1438. doi:10.4049/jimmunol.182.3.1429.
- Mousavi, S.F., P. Soroosh, T. Takahashi, Y. Yoshikai, H. Shen, L. Lefrançois, J. Borst, K. Sugamura, and N. Ishii. 2008. OX40 costimulatory signals potentiate the memory commitment of effector CD8<sup>+</sup> T cells. *J. Immunol.* 181:5990–6001. doi:10.4049/jimmunol.181.9.5990.
- Munitic, I., H. Decaluwe, C. Evaristo, S. Lemos, M. Wlodarczyk, A. Worth, A. Le Bon, L.K. Selin, Y. Rivière, J.P. Di Santo, P. Borrow, and B. Rocha. 2009. Epitope specificity and relative clonal abundance do not affect CD8 differentiation patterns during lymphocytic choriomeningitis virus infection. *Journal of Virology*. 83:11795–11807. doi:10.1128/JVI.01402-09.
- Murali-Krishna, K., and R. Ahmed. 2000. Cutting edge: naive T cells masquerading as memory cells. *The Journal of Immunology*. 165:1733–1737. doi:10.4049/jimmunol.165.4.1733.
- Murali-Krishna, K., L.L. Lau, S. Sambhara, F. Lemonnier, J. Altman, and R. Ahmed. 1999. Persistence of memory CD8 T cells in MHC class I-deficient mice. *Science*. 286:1377–1381.
- Nakanishi, Y., B. Lu, C. Gerard, and A. Iwasaki. 2009. CD8<sup>+</sup> T lymphocyte mobilization to virus-infected tissue requires CD4<sup>+</sup> T-cell help. *Nature*. 462:510–513. doi:10.1038/nature08511.
- Nelson, P.J., B.D. Ortiz, J.M. Pattison, and A.M. Krensky. 1996. Identification of a novel regulatory region critical for expression of the RANTES chemokine in activated T lymphocytes. *The Journal of Immunology*. 157:1139–1148.
- Nelson, P.J., H.T. Kim, W.C. Manning, T.J. Goralski, and A.M. Krensky. 1993. Genomic organization and transcriptional regulation of the RANTES chemokine gene. *The Journal of Immunology*. 151:2601–2612.
- Nesić, D., and S. Vukmanović. 1998. MHC class I is required for peripheral accumulation of CD8<sup>+</sup> thymic emigrants. *The Journal of Immunology*. 160:3705–3712.
- Newell, E.W., N. Sigal, S.C. Bendall, G.P. Nolan, and M.M. Davis. 2012. Cytometry by time-of-flight shows combinatorial cytokine expression and virus-specific cell niches within a continuum of CD8<sup>+</sup> T cell phenotypes. *Immunity*. 36:142–152. doi:10.1016/j.immuni.2012.01.002.
- Nguyen, L.T., and P.S. Ohashi. 2015. Clinical blockade of PD1 and LAG3--potential mechanisms of action. *Nat Rev Immunol.* 15:45–56. doi:10.1038/nri3790.
- Nikolich-Zugich, J. 2008. Ageing and life-long maintenance of T-cell subsets in the face of latent persistent infections. *Nat Rev Immunol.* 8:512–522. doi:10.1038/nri2318.
- Nolz, J.C. 2015. Molecular mechanisms of CD8(+) T cell trafficking and localization. *Cell. Mol. Life Sci.* 72:2461–2473. doi:10.1007/s00018-015-1835-0.
- Northrop, J.K., A.D. Wells, and H. Shen. 2008. Cutting edge: chromatin remodeling as a

- molecular basis for the enhanced functionality of memory CD8 T cells. *J. Immunol.* 181:865–868. doi:10.4049/jimmunol.181.2.865.
- Northrop, J.K., R.M. Thomas, A.D. Wells, and H. Shen. 2006. Epigenetic remodeling of the IL-2 and IFN-gamma loci in memory CD8 T cells is influenced by CD4 T cells. *The Journal of Immunology.* 177:1062–1069. doi:10.4049/jimmunol.177.2.1062.
- Okkenhaug, K., L. Wu, K.M. Garza, J. La Rose, W. Khoo, B. Odermatt, T.W. Mak, P.S. Ohashi, and R. Rottapel. 2001. A point mutation in CD28 distinguishes proliferative signals from survival signals. *Nature Immunology.* 2:325–332. doi:10.1038/86327.
- Omilusik, K.D., J.A. Best, B. Yu, S. Goossens, A. Weidemann, J.V. Nguyen, E. Seuntjens, A. Stryjewska, C. Zweier, R. Roychoudhuri, L. Gattinoni, L.M. Bird, Y. Higashi, H. Kondoh, D. Huylebroeck, J. Haigh, and A.W. Goldrath. 2015. Transcriptional repressor ZEB2 promotes terminal differentiation of CD8<sup>+</sup> effector and memory T cell populations during infection. *J. Exp. Med.* 212:2027–2039. doi:10.1084/jem.20150194.
- Palmer, M.J., V.S. Mahajan, J. Chen, D.J. Irvine, and D.A. Lauffenburger. 2011. Signaling thresholds govern heterogeneity in IL-7-receptor-mediated responses of naïve CD8(+) T cells. *Immunol Cell Biol.* 89:581–594. doi:10.1038/icb.2011.5.
- Parretta, E., G. Cassese, P. Barba, A. Santoni, J. Guardiola, and F. Di Rosa. 2005. CD8 cell division maintaining cytotoxic memory occurs predominantly in the bone marrow. *The Journal of Immunology.* 174:7654–7664. doi:10.4049/jimmunol.174.12.7654.
- Pearce, E.L., M.C. Walsh, P.J. Cepas, G.M. Harms, H. Shen, L.-S. Wang, R.G. Jones, and Y. Choi. 2009. Enhancing CD8 T-cell memory by modulating fatty acid metabolism. *Nature.* 460:103–107. doi:10.1038/nature08097.
- Pellegrini, M., G. Belz, P. Bouillet, and A. Strasser. 2003. Shutdown of an acute T cell immune response to viral infection is mediated by the proapoptotic Bcl-2 homology 3-only protein Bim. *Proc Natl Acad Sci USA.* 100:14175–14180. doi:10.1073/pnas.2336198100.
- Penaloza-MacMaster, P., A. Ur Rasheed, S.S. Iyer, H. Yagita, B.R. Blazar, and R. Ahmed. 2011. Opposing effects of CD70 costimulation during acute and chronic lymphocytic choriomeningitis virus infection of mice. *Journal of Virology.* 85:6168–6174. doi:10.1128/JVI.02205-10.
- Pereira, R.M., G.J. Martinez, I. Engel, F. Cruz-Guilloty, B.A. Barboza, A. Tsagaratou, C.-W.J. Lio, L.J. Berg, Y. Lee, M. Kronenberg, H.S. Bandukwala, and A. Rao. 2014. Jarid2 is induced by TCR signalling and controls iNKT cell maturation. *Nature Communications.* 5:4540. doi:10.1038/ncomms5540.
- Pircher, H., K. Bürki, R. Lang, H. Hengartner, and R.M. Zinkernagel. 1989. Tolerance induction in double specific T-cell receptor transgenic mice varies with antigen. *Nature.* 342:559–561. doi:10.1038/342559a0.
- Plumlee, C.R., B.S. Sheridan, B.B. Cicek, and L. Lefrançois. 2013. Environmental cues dictate the fate of individual CD8<sup>+</sup> T cells responding to infection. *Immunity.* 39:347–356. doi:10.1016/j.immuni.2013.07.014.
- Pober, J.S., and W.C. Sessa. 2007. Evolving functions of endothelial cells in inflammation. *Nat Rev Immunol.* 7:803–815. doi:10.1038/nri2171.

- Pollizzi, K.N., and J.D. Powell. 2014. Integrating canonical and metabolic signalling programmes in the regulation of T cell responses. 1–12. doi:10.1038/nri3701.
- Polman, C.H., P.W. O'Connor, E. Havrdova, M. Hutchinson, L. Kappos, D.H. Miller, J.T. Phillips, F.D. Lublin, G. Giovannoni, A. Wajgt, M. Toal, F. Lynn, M.A. Panzara, A.W. Sandrock, AFFIRM Investigators. 2006. A randomized, placebo-controlled trial of natalizumab for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med*. 354:899–910. doi:10.1056/NEJMoa044397.
- Pooley, J.L., W.R. Heath, and K. Shortman. 2001. Cutting edge: intravenous soluble antigen is presented to CD4 T cells by CD8- dendritic cells, but cross-presented to CD8 T cells by CD8+ dendritic cells. *The Journal of Immunology*. 166:5327–5330. doi:10.4049/jimmunol.166.9.5327.
- Prince, A.L., Z. Kraus, S.A. Carty, C. Ng, C.C. Yin, M.S. Jordan, P.L. Schwartzberg, and L.J. Berg. 2014. Development of Innate CD4+ and CD8+ T Cells in Itk-Deficient Mice Is Regulated by Distinct Pathways. *The Journal of Immunology*. 193:688–699. doi:10.4049/jimmunol.1302059.
- PRLIC, M., B.R. Blazar, A. Khoruts, T. Zell, and S.C. Jameson. 2001. Homeostatic Expansion Occurs Independently of Costimulatory Signals. *The Journal of Immunology*. 167:5664–5668. doi:10.4049/jimmunol.167.10.5664.
- Prlic, M., G. Hernandez-Hoyos, and M.J. Bevan. 2006. Duration of the initial TCR stimulus controls the magnitude but not functionality of the CD8+ T cell response. *Journal of Experimental Medicine*. 203:2135–2143. doi:10.1084/jem.20060928.
- Proudfoot, A.E.I. 2002. Chemokine receptors: multifaceted therapeutic targets. *Nat Rev Immunol*. 2:106–115. doi:10.1038/nri722.
- Rahim, M.M.A. 2014. Ly49 receptors: innate and adaptive immune paradigms. 1–11. doi:10.3389/fimmu.2014.00145/abstract.
- Rao, R.R., Q. Li, K. Odunsi, and P.A. Shrikant. 2010. The mTOR kinase determines effector versus memory CD8+ T cell fate by regulating the expression of transcription factors T-bet and Eomesodermin. *Immunity*. 32:67–78. doi:10.1016/j.immuni.2009.10.010.
- Rao, R.R., Q. Li, M.R. Gubbels Bupp, and P.A. Shrikant. 2012. Transcription factor Foxo1 represses T-bet-mediated effector functions and promotes memory CD8(+) T cell differentiation. *Immunity*. 36:374–387. doi:10.1016/j.immuni.2012.01.015.
- Raué, H.-P., C. Beadling, J. Haun, and M.K. Slifka. 2013. Cytokine-mediated programmed proliferation of virus-specific CD8(+) memory T cells. *Immunity*. 38:131–139. doi:10.1016/j.immuni.2012.09.019.
- Raué, H.-P., J.D. Brien, E. Hammarlund, and M.K. Slifka. 2004. Activation of virus-specific CD8+ T cells by lipopolysaccharide-induced IL-12 and IL-18. *The Journal of Immunology*. 173:6873–6881. doi:10.4049/jimmunol.173.11.6873.
- Raulet, D.H. 2003. Roles of the NKG2D immunoreceptor and its ligands. *Nat Rev Immunol*. 3:781–790. doi:10.1038/nri1199.
- Ray, S.J., S.N. Franki, R.H. Pierce, S. Dimitrova, V. Kotliansky, A.G. Sprague, P.C. Doherty, A.R. de Fougerolles, and D.J. Topham. 2004. The collagen binding alpha1beta1 integrin VLA-1 regulates CD8 T cell-mediated immune protection against heterologous



- influenza infection. *Immunity*. 20:167–179.
- Reiss, Y., A.E. Proudfoot, C.A. Power, J.J. Campbell, and E.C. Butcher. 2001. CC chemokine receptor (CCR)4 and the CCR10 ligand cutaneous T cell-attracting chemokine (CTACK) in lymphocyte trafficking to inflamed skin. *Journal of Experimental Medicine*. 194:1541–1547.
- Renkema, K.R., G. Li, A. Wu, M.J. Smithey, and J. Nikolich-Zugich. 2013. Two Separate Defects Affecting True Naive or Virtual Memory T Cell Precursors Combine To Reduce Naive T Cell Responses with Aging. *The Journal of Immunology*. 192:151–159. doi:10.4049/jimmunol.1301453.
- Richer, M.J., J.C. Nolz, and J.T. Harty. 2013. Pathogen-specific inflammatory milieus tune the antigen sensitivity of CD8(+) T cells by enhancing T cell receptor signaling. *Immunity*. 38:140–152. doi:10.1016/j.immuni.2012.09.017.
- Richter, M.V., and D.J. Topham. 2007. The alpha1beta1 integrin and TNF receptor II protect airway CD8+ effector T cells from apoptosis during influenza infection. *The Journal of Immunology*. 179:5054–5063. doi:10.4049/jimmunol.179.8.5054.
- Ridge, J.P., F. Di Rosa, and P. Matzinger. 1998. A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CD4+ T-helper and a T-killer cell. *Nature*. 393:474–478. doi:10.1038/30989.
- Rincón, M., and R.A. Flavell. 1994. AP-1 transcriptional activity requires both T-cell receptor-mediated and co-stimulatory signals in primary T lymphocytes. *The EMBO journal*. 13:4370–4381.
- Ritter, A.T., Y. Asano, J.C. Stinchcombe, N.M.G. Dieckmann, B.-C. Chen, C. Gawden-Bone, S. van Engelenburg, W. Legant, L. Gao, M.W. Davidson, E. Betzig, J. Lippincott-Schwartz, and G.M. Griffiths. 2015. Actin depletion initiates events leading to granule secretion at the immunological synapse. *Immunity*. 42:864–876. doi:10.1016/j.immuni.2015.04.013.
- Rochman, Y., R. Spolski, and W.J. Leonard. 2009. New insights into the regulation of T cells by gamma(c) family cytokines. *Nat Rev Immunol*. 9:480–490. doi:10.1038/nri2580.
- Rooke, R., C. Waltzinger, C. Benoist, and D. Mathis. 1997. Targeted complementation of MHC class II deficiency by intrathymic delivery of recombinant adenoviruses. *Immunity*. 7:123–134.
- Rubinstein, M.P., M. Kovar, J.F. Purton, J.-H. Cho, O. Boyman, C.D. Surh, and J. Sprent. 2006. Converting IL-15 to a superagonist by binding to soluble IL-15R{alpha}. *Proc Natl Acad Sci USA*. 103:9166–9171. doi:10.1073/pnas.0600240103.
- Rudd, C.E., A. Taylor, and H. Schneider. 2009. CD28 and CTLA-4 coreceptor expression and signal transduction. *Immunological reviews*. 229:12–26. doi:10.1111/j.1600-065X.2009.00770.x.
- Rutishauser, R.L., G.A. Martins, S. Kalachikov, A. Chandele, I.A. Parish, E. Meffre, J. Jacob, K. Calame, and S.M. Kaech. 2009. Transcriptional repressor Blimp-1 promotes CD8(+) T cell terminal differentiation and represses the acquisition of central memory T cell properties. *Immunity*. 31:296–308. doi:10.1016/j.immuni.2009.05.014.
- Sa, Q., E. Ochiai, T. Sengoku, M.E. Wilson, M. Brogli, S. Crutcher, S.A. Michie, B. Xu, L.



- Payne, X. Wang, and Y. Suzuki. 2014. VCAM-1/ $\alpha 4\beta 1$  integrin interaction is crucial for prompt recruitment of immune T cells into the brain during the early stage of reactivation of chronic infection with *Toxoplasma gondii* to prevent toxoplasmic encephalitis. *Infection and immunity*. 82:2826–2839. doi:10.1128/IAI.01494-13.
- Saito, T., T. Yokosuka, and A. Hashimoto-Tane. 2010. Dynamic regulation of T cell activation and co-stimulation through TCR-microclusters. *FEBS Lett.* 584:4865–4871. doi:10.1016/j.febslet.2010.11.036.
- Salek-Ardakani, S., R. Flynn, R. Arens, H. Yagita, G.L. Smith, J. Borst, S.P. Schoenberger, and M. Croft. 2011. The TNFR family members OX40 and CD27 link viral virulence to protective T cell vaccines in mice. *J. Clin. Invest.* 121:296–307. doi:10.1172/JCI42056.
- Sallusto, F., D. Lenig, R. Förster, M. Lipp, and A. Lanzavecchia. 1999. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature*. 401:708–712. doi:10.1038/44385.
- Salou, M., B. Nicol, A. Garcia, and D.-A. Laplaud. 2015. Involvement of CD8(+) T Cells in Multiple Sclerosis. *Front. Immunol.* 6:604. doi:10.3389/fimmu.2015.00604.
- Salzer, E., S. Daschkey, S. Choo, M. Gombert, E. Santos-Valente, S. Ginzel, M. Schwendinger, O.A. Haas, G. Fritsch, W.F. Pickl, E. Förster-Waldl, A. Borkhardt, K. Boztug, K. Bienemann, and M.G. Seidel. 2013. Combined immunodeficiency with life-threatening EBV-associated lymphoproliferative disorder in patients lacking functional CD27. *Haematologica*. 98:473–478. doi:10.3324/haematol.2012.068791.
- Sandau, M.M., C.J. Winstead, and S.C. Jameson. 2007. IL-15 is required for sustained lymphopenia-driven proliferation and accumulation of CD8 T cells. *The Journal of Immunology*. 179:120–125. doi:10.4049/jimmunol.179.1.120.
- Sandoval, F., M. Terme, M. Nizard, C. Badoual, M.-F. Bureau, L. Freyburger, O. Clement, E. Marcheteau, A. Gey, G. Fraisse, C. Bouguin, N. Merillon, E. Dransart, T. Tran, F. Quintin-Colonna, G. Autret, M. Thiebaud, M. Suleman, M. Suleman, S. Riffault, T.-C. Wu, O. Launay, C. Danel, J. Taieb, J. Richardson, L. Zitvogel, W.H. Fridman, L. Johannes, and E. Tartour. 2013. Mucosal imprinting of vaccine-induced CD8<sup>+</sup> T cells is crucial to inhibit the growth of mucosal tumors. *Science Translational Medicine*. 5:172ra20–172ra20. doi:10.1126/scitranslmed.3004888.
- Sarkar, S., V. Kalia, W.N. Haining, B.T. Konieczny, S. Subramaniam, and R. Ahmed. 2008. Functional and genomic profiling of effector CD8 T cell subsets with distinct memory fates. *J. Exp. Med.* 205:625–640. doi:10.1084/jem.20071641.
- Sasaki, K., A.D. Pardee, H. Okada, and W.J. Storkus. 2008. IL-4 inhibits VLA-4 expression on Tc1 cells resulting in poor tumor infiltration and reduced therapy benefit. *Eur. J. Immunol.* 38:2865–2873. doi:10.1002/eji.200838334.
- Sauce, D., M. Larsen, S. Fastenackels, A. Roux, G. Gorochoy, C. Katlama, D. Sidi, J. Sibony-Prat, and V. Appay. 2012. Lymphopenia-Driven Homeostatic Regulation of Naive T Cells in Elderly and Thymectomized Young Adults. *The Journal of Immunology*. 189:5541–5548. doi:10.4049/jimmunol.1201235.
- Schaerli, P., K. Willimann, A.B. Lang, M. Lipp, P. Loetscher, and B. Moser. 2000. CXC chemokine receptor 5 expression defines follicular homing T cells with B cell helper function. *Journal of Experimental Medicine*. 192:1553–1562.

- Schenkel, J.M. 2014. Resident memory CD8 T cells trigger protective innate and adaptive immune responses  
. *Science*. 346:93–98. doi:10.1126/science.1257530.
- Schenkel, J.M., K.A. Fraser, V. Vezys, and D. Masopust. 2013. Sensing and alarm function of resident memory CD8<sup>+</sup> T cells. *Nature Immunology*. 14:509–513. doi:10.1038/ni.2568.
- Schildknecht, A., I. Miescher, H. Yagita, and M. van den Broek. 2007. Priming of CD8<sup>+</sup> T cell responses by pathogens typically depends on CD70-mediated interactions with dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* 37:716–728. doi:10.1002/eji.200636824.
- Schluns, K.S. 2000. Interleukin-7 mediates the homeostasis of naïve and memory CD8 T cells. *Nature Immunology*. 1–7.
- Schluns, K.S., K. Williams, A. Ma, X.X. Zheng, and L. Lefrançois. 2002. Cutting edge: requirement for IL-15 in the generation of primary and memory antigen-specific CD8 T cells. *The Journal of Immunology*. 168:4827–4831. doi:10.4049/jimmunol.168.10.4827.
- Schluns, K.S., W.C. Kieper, S.C. Jameson, and L. Lefrancois. 2000. Interleukin-7 mediates the homeostasis of naïve and memory CD8 T cells in vivo. *Nature Immunology*. 1:426–432. doi:10.1038/80868.
- Schmidt, C.S., and M.F. Mescher. 1999. Adjuvant effect of IL-12: conversion of peptide antigen administration from tolerizing to immunizing for CD8<sup>+</sup> T cells in vivo. *The Journal of Immunology*. 163:2561–2567.
- Schoenberger, S.P. 1998. T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40–CD40L interactions. *Nature*. 1–4.
- Schön, M.P., T.M. Zollner, and W.H. Boehncke. 2003. The molecular basis of lymphocyte recruitment to the skin: clues for pathogenesis and selective therapies of inflammatory disorders. *J. Invest. Dermatol.* 121:951–962. doi:10.1046/j.1523-1747.2003.12563.x.
- Schroder, K., P.J. Hertzog, T. Ravasi, and D.A. Hume. 2004. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *Journal of Leukocyte Biology*. 75:163–189. doi:10.1189/jlb.0603252.
- Schüler, T., G.J. Hammerling, and B. Arnold. 2004. Cutting edge: IL-7-dependent homeostatic proliferation of CD8<sup>+</sup> T cells in neonatal mice allows the generation of long-lived natural memory T cells. *The Journal of Immunology*. 172:15–19. doi:10.4049/jimmunol.172.1.15.
- Schwartz, R.H. 2003. T cell anergy. *Annu. Rev. Immunol.* 21:305–334. doi:10.1146/annurev.immunol.21.120601.141110.
- Scimone, M.L., T.W. Felbinger, I.B. Mazo, J.V. Stein, U.H. von Andrian, and W. Weninger. 2004. CXCL12 mediates CCR7-independent homing of central memory cells, but not naïve T cells, in peripheral lymph nodes. *Journal of Experimental Medicine*. 199:1113–1120. doi:10.1084/jem.20031645.
- Sckisel, G.D., J.K. Tietze, A.E. Zamora, H.-H. Hsiao, S.O. Priest, D.E.C. Wilkins, L.L. Lanier, B.R. Blazar, N. Baumgarth, and W.J. Murphy. 2013. Influenza infection results in local expansion of memory CD8<sup>+</sup> T cells with antigen non-specific phenotype and function. *Clin Exp Immunol.* 175:79–91. doi:10.1111/cei.12186.

- Sckisel, G.D., J.K. Tietze, A.E. Zamora, H.-H. Hsiao, S.O. Priest, D.E.C. Wilkins, L.L. Lanier, B.R. Blazar, N. Baumgarth, and W.J. Murphy. 2014. Influenza infection results in local expansion of memory CD8(+) T cells with antigen non-specific phenotype and function. *Clin Exp Immunol.* 175:79–91. doi:10.1111/cei.12186.
- Seddon, B., and R. Zamoyska. 2002. TCR signals mediated by Src family kinases are essential for the survival of naïve T cells. *The Journal of Immunology.* 169:2997–3005. doi:10.4049/jimmunol.169.6.2997.
- Seddon, B., G. Legname, P. Tomlinson, and R. Zamoyska. 2000. Long-term survival but impaired homeostatic proliferation of Naïve T cells in the absence of p56lck. *Science.* 290:127–131.
- Sha, W.C., C.A. Nelson, R.D. Newberry, D.M. Kranz, J.H. Russell, and D.Y. Loh. 1988. Selective expression of an antigen receptor on CD8-bearing T lymphocytes in transgenic mice. *Nature.* 335:271–274. doi:10.1038/335271a0.
- Sharma, A., Q. Chen, T. Nguyen, Q. Yu, and J.M. Sen. 2012. T cell factor-1 and  $\beta$ -catenin control the development of memory-like CD8 thymocytes. *J. Immunol.* 188:3859–3868. doi:10.4049/jimmunol.1103729.
- Shedlock, D.J., J.K. Whitmire, J. Tan, A.S. MacDonald, R. Ahmed, and H. Shen. 2003. Role of CD4 T cell help and costimulation in CD8 T cell responses during *Listeria* monocytogenes infection. *The Journal of Immunology.* 170:2053–2063. doi:10.4049/jimmunol.170.4.2053.
- Sheridan, B.S., Q.-M. Pham, Y.-T. Lee, L.S. Cauley, L. Puddington, and L. Lefrançois. 2014. Oral infection drives a distinct population of intestinal resident memory CD8(+) T cells with enhanced protective function. *Immunity.* 40:747–757. doi:10.1016/j.immuni.2014.03.007.
- Shin, H., and A. Iwasaki. 2012. A vaccine strategy that protects against genital herpes by establishing local memory T cells. *Nature.* 491:463–467. doi:10.1038/nature11522.
- Sigal, L.J., S. Crotty, R. Andino, and K.L. Rock. 1999. Cytotoxic T-cell immunity to virus-infected non-haematopoietic cells requires presentation of exogenous antigen. *Nature.* 398:77–80. doi:10.1038/18038.
- Singer, A., S. Adoro, and J.-H. Park. 2008. Lineage fate and intense debate: myths, models and mechanisms of CD4- versus CD8-lineage choice. *Nat Rev Immunol.* 8:788–801. doi:10.1038/nri2416.
- Singh, A., and M. Suresh. 2007. A role for TNF in limiting the duration of CTL effector phase and magnitude of CD8 T cell memory. *Journal of Leukocyte Biology.* 82:1201–1211. doi:10.1189/jlb.0407240.
- Sintes, J., M. Cuenca, X. Romero, R. Bastos, C. Terhorst, A. Angulo, and P. Engel. 2013. Cutting edge: Ly9 (CD229), a SLAM family receptor, negatively regulates the development of thymic innate memory-like CD8+ T and invariant NKT cells. *J. Immunol.* 190:21–26. doi:10.4049/jimmunol.1202435.
- Slütter, B., L.L. Pewe, S.M. Kaech, and J.T. Harty. 2013. Lung airway-surveilling CXCR3(hi) memory CD8(+) T cells are critical for protection against influenza A virus. *Immunity.* 39:939–948. doi:10.1016/j.immuni.2013.09.013.

- Smyth, M.J., S.E.A. Street, and J.A. Trapani. 2003. Cutting edge: granzymes A and B are not essential for perforin-mediated tumor rejection. *The Journal of Immunology*. 171:515–518. doi:10.4049/jimmunol.171.2.515.
- Song, A., A. Patel, K. Thamatrakoln, C. Liu, D. Feng, C. Clayberger, and A.M. Krensky. 2002. Functional domains and DNA-binding sequences of RFLAT-1/KLF13, a Krüppel-like transcription factor of activated T lymphocytes. *J. Biol. Chem.* 277:30055–30065. doi:10.1074/jbc.M204278200.
- Song, A., T. Nikolcheva, and A.M. Krensky. 2000. Transcriptional regulation of RANTES expression in T lymphocytes. *Immunological reviews*. 177:236–245.
- Song, A., Y.F. Chen, K. Thamatrakoln, T.A. Storm, and A.M. Krensky. 1999. RFLAT-1: a new zinc finger transcription factor that activates RANTES gene expression in T lymphocytes. *Immunity*. 10:93–103.
- Sosinowski, T., J.T. White, E.W. Cross, C. Haluszczak, P. Marrack, L. Gapin, and R.M. Kedl. 2013. CD8 $\alpha$ + dendritic cell trans presentation of IL-15 to naive CD8+ T cells produces antigen-inexperienced T cells in the periphery with memory phenotype and function. *J. Immunol.* 190:1936–1947. doi:10.4049/jimmunol.1203149.
- Sotsios, Y., P.J. Blair, J. Westwick, and S.G. Ward. 2000. Disparate effects of phorbol esters, CD3 and the costimulatory receptors CD2 and CD28 on RANTES secretion by human T lymphocytes. *Immunology*. 101:30–37.
- Soudja, S.M., A.L. Ruiz, J.C. Marie, and G. Lauvau. 2012. Inflammatory monocytes activate memory CD8(+) T and innate NK lymphocytes independent of cognate antigen during microbial pathogen invasion. *Immunity*. 37:549–562. doi:10.1016/j.immuni.2012.05.029.
- Sprent, J., J.-H. Cho, O. Boyman, and C.D. Surh. 2008. T cell homeostasis. *Immunol Cell Biol.* 86:312–319. doi:10.1038/icb.2008.12.
- Starbeck-Miller, G.R., H.-H. Xue, and J.T. Harty. 2014. IL-12 and type I interferon prolong the division of activated CD8 T cells by maintaining high-affinity IL-2 signaling in vivo. *J. Exp. Med.* 211:105–120. doi:10.1084/jem.20130901.
- Stemberger, C., K.M. Huster, M. Koffler, F. Anderl, M. Schiemann, H. Wagner, and D.H. Busch. 2007. A single naive CD8+ T cell precursor can develop into diverse effector and memory subsets. *Immunity*. 27:985–997. doi:10.1016/j.immuni.2007.10.012.
- Strasser, A., P.J. Jost, and S. Nagata. 2009. The many roles of FAS receptor signaling in the immune system. *Immunity*. 30:180–192. doi:10.1016/j.immuni.2009.01.001.
- Sträter, J., and P. Möller. 2004. TRAIL and viral infection. *Vitam. Horm.* 67:257–274. doi:10.1016/S0083-6729(04)67014-2.
- Su, L.F., B.A. Kidd, A. Han, J.J. Kotzin, and M.M. Davis. 2013. Virus-specific CD4(+) memory-phenotype T cells are abundant in unexposed adults. *Immunity*. 38:373–383. doi:10.1016/j.immuni.2012.10.021.
- Sun, J.C., and M.J. Bevan. 2003. Defective CD8 T cell memory following acute infection without CD4 T cell help. *Science*. 300:339–342. doi:10.1126/science.1083317.
- Sung, J.H., H. Zhang, E.A. Moseman, D. Alvarez, M. Iannacone, S.E. Henrickson, J.C. de la Torre, J.R. Groom, A.D. Luster, and U.H. von Andrian. 2012. Chemokine guidance of

- central memory T cells is critical for antiviral recall responses in lymph nodes. *Cell*. 150:1249–1263. doi:10.1016/j.cell.2012.08.015.
- Suresh, M., A. Singh, and C. Fischer. 2005. Role of tumor necrosis factor receptors in regulating CD8 T-cell responses during acute lymphocytic choriomeningitis virus infection. *Journal of Virology*. 79:202–213. doi:10.1128/JVI.79.1.202-213.2005.
- Surh, C.D. 1994. T-cell apoptosis detected in situ during positive and negative selection in the thymus. *Nature*. 1–4.
- Svensson, M., J. Marsal, A. Ericsson, L. Carramolino, T. Brodén, G. Márquez, and W.W. Agace. 2002. CCL25 mediates the localization of recently activated CD8 $\alpha$ beta(+) lymphocytes to the small-intestinal mucosa. *J. Clin. Invest.* 110:1113–1121. doi:10.1172/JCI15988.
- Takemoto, N., A.M. Intlekofer, J.T. Northrup, E.J. Wherry, and S.L. Reiner. 2006. Cutting Edge: IL-12 inversely regulates T-bet and eomesodermin expression during pathogen-induced CD8 $^{+}$  T cell differentiation. *The Journal of Immunology*. 177:7515–7519. doi:10.4049/jimmunol.177.11.7515.
- Talebian, L., D.A. Fischer, J. Wu, J.Y. Channon, C.L. Sentman, M.S. Ernstoff, and K.R. Meehan. 2014. The natural killer-activating receptor, NKG2D, on CD3 $^{+}$ CD8 $^{+}$  T cells plays a critical role in identifying and killing autologous myeloma cells. *Transfusion*. 54:1515–1521. doi:10.1111/trf.12517.
- Tan, J.T., B. Ernst, W.C. Kieper, E. LeRoy, J. Sprent, and C.D. Surh. 2002. Interleukin (IL)-15 and IL-7 jointly regulate homeostatic proliferation of memory phenotype CD8 $^{+}$  cells but are not required for memory phenotype CD4 $^{+}$  cells. *Journal of Experimental Medicine*. 195:1523–1532. doi:10.1084/jem.20020066.
- Tan, J.T., E. Dudl, E. LeRoy, R. Murray, J. Sprent, K.I. Weinberg, and C.D. Surh. 2001. IL-7 is critical for homeostatic proliferation and survival of naive T cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 98:8732–8737. doi:10.1073/pnas.161126098.
- Tan, J.T., J.K. Whitmire, R. Ahmed, T.C. Pearson, and C.P. Larsen. 1999. 4-1BB ligand, a member of the TNF family, is important for the generation of antiviral CD8 T cell responses. *The Journal of Immunology*. 163:4859–4868.
- Tanchot, C. 1997. Differential Requirements for Survival and Proliferation of CD8 Naïve or Memory T Cells. *Science*. 1–7.
- Tarakhovsky, A., S.B. Kanner, J. Hombach, J.A. Ledbetter, W. Müller, N. Killeen, and K. Rajewsky. 1995. A role for CD5 in TCR-mediated signal transduction and thymocyte selection. *Science*. 269:535–537.
- Tascon, R.E., E. Stavropoulos, K.V. Lukacs, and M.J. Colston. 1998. Protection against Mycobacterium tuberculosis infection by CD8 $^{+}$  T cells requires the production of gamma interferon. *Infection and immunity*. 66:830–834.
- Teixeiro, E., M.A. Daniels, S.E. Hamilton, A.G. Schrum, R. Bragado, S.C. Jameson, and E. Palmer. 2009. Different T cell receptor signals determine CD8 $^{+}$  memory versus effector development. *Science*. 323:502–505. doi:10.1126/science.1163612.
- Thiery, J., D. Keefe, S. Boulant, E. Boucrot, M. Walch, D. Martinvalet, I.S. Goping, R.C. Bleackley, T. Kirchhausen, and J. Lieberman. 2011. Perforin pores in the endosomal



- membrane trigger the release of endocytosed granzyme B into the cytosol of target cells. *Nature Publishing Group*. 12:770–777. doi:10.1038/ni.2050.
- Thimme, R., V. Appay, M. Koschella, E. Panther, E. Roth, A.D. Hislop, A.B. Rickinson, S.L. Rowland-Jones, H.E. Blum, and H. Pircher. 2005. Increased expression of the NK cell receptor KLRG1 by virus-specific CD8 T cells during persistent antigen stimulation. *Journal of Virology*. 79:12112–12116. doi:10.1128/JVI.79.18.12112-12116.2005.
- Topham, D.J., R.A. Tripp, and P.C. Doherty. 1997. CD8+ T cells clear influenza virus by perforin or Fas-dependent processes. *The Journal of Immunology*. 159:5197–5200.
- Trautmann, L., L. Janbazian, N. Chomont, E.A. Said, S. Gimmig, B. Bessette, M.-R. Boulassel, E. Delwart, H. Sepulveda, R.S. Balderas, J.-P. Routy, E.K. Haddad, and R.-P. Sekaly. 2006. Upregulation of PD-1 expression on HIV-specific CD8+ T cells leads to reversible immune dysfunction. *Nat Med*. 12:1198–1202. doi:10.1038/nm1482.
- Ueda-Hayakawa, I., J. Mahlios, and Y. Zhuang. 2009. Id3 restricts the developmental potential of gamma delta lineage during thymopoiesis. *J. Immunol*. 182:5306–5316. doi:10.4049/jimmunol.0804249.
- van Montfrans, J.M., A.I.M. Hoepelman, S. Otto, M. van Gijn, L. van de Corput, R.A. de Weger, L. Monaco-Shawver, P.P. Banerjee, E.A.M. Sanders, C.M. Jol-van der Zijde, M.R. Betts, J.S. Orange, A.C. Bloem, and K. Tesselaar. 2012. CD27 deficiency is associated with combined immunodeficiency and persistent symptomatic EBV viremia. *J. Allergy Clin. Immunol*. 129:787–793.e6. doi:10.1016/j.jaci.2011.11.013.
- Vance, R.E., J.R. Kraft, J.D. Altman, P.E. Jensen, and D.H. Raulet. 1998. Mouse CD94/NKG2A is a natural killer cell receptor for the nonclassical major histocompatibility complex (MHC) class I molecule Qa-1(b). *Journal of Experimental Medicine*. 188:1841–1848.
- Veiga-Fernandes, H., U. Walter, C. Bourgeois, A. McLean, and B. Rocha. 2000. Response of naïve and memory CD8+ T cells to antigen stimulation in vivo. *Nature Immunology*. 1:47–53. doi:10.1038/76907.
- Ventre, E., L. Brinza, S. Schicklin, J. Mafille, C.-A. Coupet, A. Marçais, S. Djebali, V. Jubin, T. Walzer, and J. Marvel. 2012. Negative regulation of NKG2D expression by IL-4 in memory CD8 T cells. *J. Immunol*. 189:3480–3489. doi:10.4049/jimmunol.1102954.
- Verykokakis, M., M.D. Boos, A. Bendelac, and B.L. Kee. 2010a. SAP protein-dependent natural killer T-like cells regulate the development of CD8(+) T cells with innate lymphocyte characteristics. *Immunity*. 33:203–215. doi:10.1016/j.immuni.2010.07.013.
- Verykokakis, M., M.D. Boos, A. Bendelac, E.J. Adams, P. Pereira, and B.L. Kee. 2010b. Inhibitor of DNA Binding 3 Limits Development of Murine Slam-Associated Adaptor Protein-Dependent “Innate”  $\gamma\delta$  T cells. *PLoS ONE*. 5:e9303. doi:10.1371/journal.pone.0009303.
- Vijh. 1998. Effect of Antigen-Processing Efficiency on In Vivo T Cell Response Magnitudes. *The Journal of Immunology*. 1–8.
- Voskoboinik, I., J.C. Whisstock, and J.A. Trapani. 2015. Perforin and granzymes: function, dysfunction and human pathology. *Nat Rev Immunol*. 15:388–400. doi:10.1038/nri3839.
- Votavova, P., J. Tomala, and M. Kovar. 2014. Increasing the biological activity of IL-2 and



- IL-15 through complexing with anti-IL-2 mAbs and IL-15R $\alpha$ -Fc chimera. *Immunology Letters*. 159:1–10. doi:10.1016/j.imlet.2014.01.017.
- Wakim, L.M., A. Woodward-Davis, and M.J. Bevan. 2010. Memory T cells persisting within the brain after local infection show functional adaptations to their tissue of residence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107:17872–17879. doi:10.1073/pnas.1010201107.
- Walzer, T., A. Marçais, F. Saltel, C. Bella, P. Jurdic, and J. Marvel. 2003. Cutting edge: immediate RANTES secretion by resting memory CD8 T cells following antigenic stimulation. *The Journal of Immunology*. 170:1615–1619.
- Way, S.S., C. Haveran-Daughton, G.A. Kolumam, N.N. Orgun, and K. Murali-Krishna. 2007. IL-12 and type-I IFN synergize for IFN-gamma production by CD4 T cells, whereas neither are required for IFN-gamma production by CD8 T cells after *Listeria monocytogenes* infection. *The Journal of Immunology*. 178:4498–4505. doi:10.4049/jimmunol.178.7.4498.
- Weant, A.E., R.D. Michalek, I.U. Khan, B.C. Holbrook, M.C. Willingham, and J.M. Grayson. 2008. Apoptosis regulators Bim and Fas function concurrently to control autoimmunity and CD8<sup>+</sup> T cell contraction. *Immunity*. 28:218–230. doi:10.1016/j.immuni.2007.12.014.
- Weinreich, M.A., K. Takada, C. Skon, S.L. Reiner, S.C. Jameson, and K.A. Hogquist. 2009. KLF2 Transcription-Factor Deficiency in T Cells Results in Unrestrained Cytokine Production and Upregulation of Bystander Chemokine Receptors. *Immunity*. 31:122–130. doi:10.1016/j.immuni.2009.05.011.
- Weinreich, M.A., O.A. Odumade, S.C. Jameson, and K.A. Hogquist. 2010. T cells expressing the transcription factor PLZF regulate the development of memory-like CD8<sup>+</sup> T cells. *Nature Publishing Group*. 11:709–716. doi:10.1038/ni.1898.
- Weng, N.-P., Y. Araki, and K. Subedi. 2012. The molecular basis of the memory T cell response: differential gene expression and its epigenetic regulation. *Nat Rev Immunol*. 12:306–315. doi:10.1038/nri3173.
- Wensveen, F.M., M. Lenartic, V. Jelencic, N.A.W. Lemmermann, A. ten Brinke, S. Jonjic, and B. Polic. 2013. NKG2D Induces Mcl-1 Expression and Mediates Survival of CD8 Memory T Cell Precursors via Phosphatidylinositol 3-Kinase. *The Journal of Immunology*. 191:1307–1315. doi:10.4049/jimmunol.1300670.
- Wherry, E.J., K.A. Purro, A. Porgador, and L.C. Eisenlohr. 1999. The induction of virus-specific CTL as a function of increasing epitope expression: responses rise steadily until excessively high levels of epitope are attained. *The Journal of Immunology*. 163:3735–3745.
- Wherry, E.J., V. Teichgräber, T.C. Becker, D. Masopust, S.M. Kaech, R. Antia, U.H. von Andrian, and R. Ahmed. 2003. Lineage relationship and protective immunity of memory CD8 T cell subsets. *Nature Immunology*. 4:225–234. doi:10.1038/ni889.
- Whitman, E., and A. Barber. 2015. NKG2D receptor activation of NF- $\kappa$ B enhances inflammatory cytokine production in murine effector CD8(+) T cells. *Molecular Immunology*. 63:268–278. doi:10.1016/j.molimm.2014.07.015.
- WIESEL, M., and A. OXENIUS. 2012. From crucial to negligible: functional CD8<sup>+</sup> T-cell responses and their dependence on CD4<sup>+</sup> T-cell help. *Eur. J. Immunol*. 42:1080–1088. doi:10.1002/eji.201142205.

- Wilson, E.B., and A.M. Livingstone. 2008. Cutting edge: CD4<sup>+</sup> T cell-derived IL-2 is essential for help-dependent primary CD8<sup>+</sup> T cell responses. *J. Immunol.* 181:7445–7448. doi:10.4049/jimmunol.181.11.7445.
- Witherden, D., N. van Oers, C. Waltzinger, A. Weiss, C. Benoist, and D. Mathis. 2000. Tetracycline-controllable selection of CD4(+) T cells: half-life and survival signals in the absence of major histocompatibility complex class II molecules. *Journal of Experimental Medicine.* 191:355–364.
- Wojciechowski, S., M.B. Jordan, Y. Zhu, J. White, A.J. Zajac, and D.A. Hildeman. 2006. Bim mediates apoptosis of CD127(lo) effector T cells and limits T cell memory. *Eur. J. Immunol.* 36:1694–1706. doi:10.1002/eji.200635897.
- Xiao, Z., K.A. Casey, S.C. Jameson, J.M. Curtsinger, and M.F. Mescher. 2009. Programming for CD8 T cell memory development requires IL-12 or type I IFN. *J. Immunol.* 182:2786–2794. doi:10.4049/jimmunol.0803484.
- Yang, C.Y., J.A. Best, J. Knell, E. Yang, A.D. Sheridan, A.K. Jesionek, H.S. Li, R.R. Rivera, K.C. Lind, L.M. D’Cruz, S.S. Watowich, C. Murre, and A.W. Goldrath. 2011. The transcriptional regulators Id2 and Id3 control the formation of distinct memory CD8<sup>+</sup> T cell subsets. *Nature Publishing Group.* 12:1221–1229. doi:10.1038/ni.2158.
- Yin, C.C., O.H. Cho, K.E. Sylvia, K. Narayan, A.L. Prince, J.W. Evans, J. Kang, and L.J. Berg. 2013. The Tec kinase ITK regulates thymic expansion, emigration, and maturation of  $\gamma\delta$  NKT cells. *J. Immunol.* 190:2659–2669. doi:10.4049/jimmunol.1202531.
- Yin, Y.W., and T.A. Steitz. 2002. Structural basis for the transition from initiation to elongation transcription in T7 RNA polymerase. *Science.* 298:1387–1395. doi:10.1126/science.1077464.
- Yokosuka, T., K. Sakata-Sogawa, W. Kobayashi, M. Hiroshima, A. Hashimoto-Tane, M. Tokunaga, M.L. Dustin, and T. Saito. 2005. Newly generated T cell receptor microclusters initiate and sustain T cell activation by recruitment of Zap70 and SLP-76. *Nature Immunology.* 6:1253–1262. doi:10.1038/ni1272.
- Yokosuka, T., W. Kobayashi, M. Takamatsu, K. Sakata-Sogawa, H. Zeng, A. Hashimoto-Tane, H. Yagita, M. Tokunaga, and T. Saito. 2010. Spatiotemporal basis of CTLA-4 costimulatory molecule-mediated negative regulation of T cell activation. *Immunity.* 33:326–339. doi:10.1016/j.immuni.2010.09.006.
- Young, K.G., S. Maclean, R. Dudani, L. Krishnan, and S. Sad. 2011. CD8<sup>+</sup> T cells primed in the periphery provide time-bound immune-surveillance to the central nervous system. *J. Immunol.* 187:1192–1200. doi:10.4049/jimmunol.1100695.
- Yuzefpolskiy, Y., F.M. Baumann, V. Kalia, and S. Sarkar. 2015. Early CD8 T-cell memory precursors and terminal effectors exhibit equipotent in vivo degranulation. *Cell. Mol. Immunol.* 12:400–408. doi:10.1038/cmi.2014.48.
- Zehn, D., S.Y. Lee, and M.J. Bevan. 2009. Complete but curtailed T-cell response to very low-affinity antigen. *Nature.* 458:211–214. doi:10.1038/nature07657.
- Zhou, F. 2009. Molecular mechanisms of IFN- $\gamma$  to up-regulate MHC class I antigen processing and presentation. *Int. Rev. Immunol.* 28:239–260. doi:10.1080/08830180902978120.

- Zhou, X., and H.-H. Xue. 2012. Cutting edge: generation of memory precursors and functional memory CD8<sup>+</sup> T cells depends on T cell factor-1 and lymphoid enhancer-binding factor-1. *J. Immunol.* 189:2722–2726. doi:10.4049/jimmunol.1201150.
- Zhou, X., S. Yu, D.-M. Zhao, J.T. Harty, V.P. Badovinac, and H.-H. Xue. 2010. Differentiation and persistence of memory CD8(+) T cells depend on T cell factor 1. *Immunity.* 33:229–240. doi:10.1016/j.immuni.2010.08.002.
- Zhu, S., P.V. Phatarpekar, C.J. Denman, V.V. Senyukov, S.S. Somanchi, H.T. Nguyen-Jackson, E.M. Mace, A.F. Freeman, S.S. Watowich, J.S. Orange, S.M. Holland, and D.A. Lee. 2014. Transcription of the activating receptor NKG2D in natural killer cells is regulated by STAT3 tyrosine phosphorylation. *Blood.* 124:403–411. doi:10.1182/blood-2013-05-49970

## Identification de nouveaux biomarqueurs permettant la caractérisation des lymphocytes T CD8 mémoires innés

Deux grandes classes de cellules composent le pool de lymphocytes T (LT) CD8 mémoires. D'une part, les LT CD8 mémoires **conventionnels** sont générés via la reconnaissance spécifique d'antigènes dérivés de pathogènes ou de tumeurs. D'autre part, les LT CD8 mémoires **innés** sont générés via différents mécanismes impliquant de fortes stimulations par des cytokines  $\gamma c$  indépendamment de la reconnaissance d'antigènes du non soi. Le phénotype extrêmement similaire de ces deux populations cellulaires ne permet pas de les distinguer *in vivo*. En conséquence, la population de LT CD8 mémoires innés est relativement peu caractérisée.

Mon travail de thèse comportait donc deux objectifs majeurs :

1 / Identifier des marqueurs permettant de distinguer *in vivo* ces deux classes de LT CD8 mémoires.

2/ Caractériser la population de LT CD8 mémoires innés.

Dans cette étude, nous démontrons qu'au sein du pool de LT CD8 mémoires, seules les cellules conventionnelles expriment la chimiokine CCL5 et le récepteur NKG2D. Ces deux biomarqueurs permettent ainsi pour la première fois de distinguer les LT CD8 mémoires innés et conventionnels *in vivo*, à la fois chez la souris et chez l'homme. Grâce à l'expression de NKG2D, nous démontrons que ces LT CD8 mémoires innés possèdent des caractéristiques typiques de cellules mémoires, notamment une réactivité augmentée ainsi qu'un programme génétique comparable à celui des LT CD8 mémoires conventionnels. Néanmoins, cette population cellulaire conserve certaines caractéristiques de cellules naïves. Ainsi, le répertoire TCR diversifié de cette population cellulaire permet à ces cellules de participer à des réponses immunitaires primaires contre différents pathogènes. Enfin, dans un contexte inflammatoire, les LT CD8 mémoires innés présentent un défaut d'accès au tissu pulmonaire comparé aux LT CD8 mémoires conventionnels. Ceci corrèle avec un déficit d'expression de certaines intégrines par les LT CD8 mémoires innés. L'ensemble de nos résultats démontre que les LT CD8 mémoires innés, caractérisés par l'absence d'expression de CCL5 et NKG2D, constituent une population cellulaire hybride, à la frontière entre cellules naïves et cellules mémoires conventionnelles.

**Mots clés :** mémoire immunitaire, lymphocyte T CD8 mémoire inné, biomarqueurs, CCL5, NKG2D.